

Aus dem Institut/der Klinik für Rheumatologie/Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

Immunmodulation autologer Tissue-Engineering-Transplantate in vivo

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Frank Wanjura
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter:

PD Dr. M. Sittinger, Experimentelle Rheumatologie und Tissue Engineering, Charité

Prof. Dr. H. Scherer, Abt. f. Hals-, Nasen-, Ohrenkrankheiten, Universitätsklinikum
Benjamin Franklin, Berlin

Prof. Dr. Dr. R. Schmelzeisen, Universitätsklinik f. Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie,
Freiburg

Datum der Einreichung: 23. Januar 2002

Datum der Promotion: 7. Oktober 2002

Abstrakt

Im medizinischen Alltag steht Gewebeersatz oftmals nicht ausreichend zur Verfügung. Tissue Engineering (TE) bietet eine wertvolle Methode, um aus wenigen Zellen des gewünschten Gewebes größere Strukturen herzustellen. Aber selbst autologe über Tissue Engineering gebildete Gewebe können einer Abstoßung unterliegen. Diese Arbeit befaßt sich daher mit der Immunmodulation von TE-Transplantaten.

Chondrocyten wurden aus Ohrknorpel von Neuseeland-Kaninchen enzymatisch isoliert, in Zellkultur vermehrt und wurden a) in allogenen Fibrinkleber oder b) in Agarose suspendiert, dann in ein Scaffold eingebracht. 24 Transplantate wurden zusätzlich mit einer Polyelektrolyt – Kapsel versehen. Nativer Ohrknorpel diente als Kontrolle. So entstanden n=84 Transplantate, 14 autologe Transplantate pro Kaninchen: jeweils 2 native, 4 Fibrin-, 4 Agarose- und 4 Kapsel-Transplantate.

Die 1cm x 1cm x 0.2 cm großen Transplantate wurden subkutan auf dem Rücken der Kaninchen implantiert. Eine der in zwei Gruppen aufgeteilten Kaninchen erhielt eine 3 wöchige i. m. Gabe von Methylprednisolon. 70 Transplantate wurden in 5 Versuchstiere implantiert. 14 Transplantate wurden in vitro ernährt. 2 Kaninchen wurden nach 6 Wochen getötet und die Transplantate entnommen. 3 Kaninchen wurden nach 12 Wochen getötet. Im Anschluß wurden die Transplantate histologisch untersucht.

Die Transplantate der nicht immunmodulierten Tiere konnten zu den Entnahmezeitpunkten 6 und 12 Wochen kaum aus den Implantationsorten entnommen werden: sie waren nur schwer vom umliegenden Gewebe zu unterscheiden. Die Transplantate der immunmodulierten Tiere blieben in ihrer Größe konstant.

Histologisch zeigte sich bei den nicht immunmodulierten Tieren nach 6 Wochen massive zelluläre Infiltration, nach 12 Wochen die Einwachsung von Fibrozyten und kaum noch Knorpel- oder Knochengewebe. In der Gruppe der immunmodulierten Tiere konnte keine bis eine geringe Inflammation festgestellt werden. Bis auf die nativen Transplantate, war in dieser Gruppe bei allen Transplantaten vitaler trabekulärer Knochen mit hämatopoetisch aktivem Knochenmark zu beobachten.

Der Vergleich der Gruppen „Nicht immunmoduliert“ und „Immunmoduliert“ war hinsichtlich der Immunreaktionen statistisch signifikant (Chi-Quadrat Test nach Pearson).

Tissue-Engineering

Immunmodulation

Prednisolon

Knorpel

Knochen

Abstract

Tissue replacement is a common need in clinical medicine. And often there is too less tissue available. Tissue Engineering (TE) is a valuable measure to solve this problem: only a few cells of the origin tissue are cultivated and new threedimensional structures are built. But even autologously built tissues can be rejected by the host. Therefore, this investigation is about immunomodulation of TE-transplants.

Chondrocytes of ear cartilage of New Zealand rabbits were enzymatically isolated, amplified and were solved in a) allogenic fibrin glue or b) agarose. Then they were taken into scaffolds. 24 transplants were encapsulated by a polyelectrolyte-complex membrane. Native cartilage served as control. There were formed $n=84$ transplants, 14 autologous transplant per rabbit: each with 2 native, 4 fibrin-, 4 agarose- and 4 capsule-transplants. The transplants' size was 1 cm x 1 cm x 0.2 cm. The rabbits were divided into two groups – one of the group has been treated with methylprednisolone IM for 3 weeks. 70 transplants were taken into the ridge of 5 rabbits. 14 transplants were cultivated in vitro. 2 rabbits were sacrificed after 6 weeks and 3 rabbits after 12 weeks. Afterwards the transplants were investigated histologically.

The transplants of the non-immunomodulated group could hardly be separated from the surrounding tissue, whereas the transplants of the immunomodulated group remained constant in size and shape.

Histologically, the non-immunomodulated transplants underwent cellular (granulocytes) infiltration after 6 weeks, respectively ingrowth of fibrocytes after 12 weeks. No cartilage or bone could be evident.

In the immunomodulated group no signs of inflammation were identifiable after 6 and 12 weeks. In all transplants of this group bone formation with hematopoietically-active bone marrow was detectable. The native control-cartilage had not become bone, inflammation was not evident there.

The difference of the two groups “non-immunomodulated” and “immunomodulated” was statistically significant concerning the degree of inflammation. (Chi-square-test).

Tissue Engineering

Immunomodulation

Prednisolone

Cartilage

Bone

1	EINLEITUNG	10
1.1	TISSUE ENGINEERING.....	10
1.1.1	<i>Definition des Tissue Engineering</i>	<i>10</i>
1.1.2	<i>Prinzip des Tissue Engineering.....</i>	<i>10</i>
1.2	KNORPEL.....	11
1.2.1	<i>Abstammung.....</i>	<i>11</i>
1.2.2	<i>Extrazelluläre Matrix.....</i>	<i>11</i>
1.2.2.1	Knorpelgrundsubstanz	11
1.2.2.1.1	Proteoglykane.....	11
1.2.2.1.2	Glykoproteine.....	12
1.2.2.1.3	Interstitielle Flüssigkeit.....	12
1.2.2.2	Bindegewebsfasern	12
1.2.2.2.1	Kollagen	12
1.2.2.2.2	Elastin.....	12
1.3	ENTZÜNDUNGSREAKTION.....	12
1.4	TRANSPLANTATION.....	13
1.4.1	<i>Die autologe Transplantation</i>	<i>13</i>
1.4.2	<i>Die allogene Transplantation</i>	<i>13</i>
1.4.3	<i>Die syngene Transplantation</i>	<i>13</i>
1.4.4	<i>Die xenogene Transplantation.....</i>	<i>13</i>
1.4.5	<i>Heterotope Transplantation.....</i>	<i>13</i>
1.4.6	<i>Isotope und orthotope Transplantation.....</i>	<i>14</i>
1.5	IMMUNOLOGISCHE GESCHEHEN BEI TRANSPLANTAT-EMPFÄNGERN.....	14
1.5.1	<i>Abstoßungsreaktionen und ihre Characterisitika</i>	<i>14</i>
1.5.1.1	Akute Abstoßung	14
1.5.1.2	Andere Formen der Abstoßung.....	14
1.6	MEDIKAMENTÖSE IMMUNSUPPRESSION	15
1.7	GLUCOCORTICOIDE	15
1.7.1	<i>Wirkungen von Cortisol auf den Organismus.....</i>	<i>15</i>
1.7.2	<i>Wirkungen des Cortisols in pharmakologischer Dosis.....</i>	<i>15</i>
1.7.3	<i>Methylprednisolon</i>	<i>16</i>
1.8	ERGEBNISSE BISHERIGER VERSUCHE.....	17
1.9	ZIELE DER ARBEIT	18
1.10	VERSUCHSABLAUF	18

1.11	VERSUCHSABLAUFPLAN.....	19
2	MATERIAL, TIERMODELL UND METHODEN.....	20
2.1	MATERIAL.....	20
2.1.1	<i>Geräte.....</i>	20
2.1.2	<i>Scaffold.....</i>	20
2.1.3	<i>Rohmedien.....</i>	21
2.1.4	<i>Reagenzien und Lösungen.....</i>	21
2.1.5	<i>Enzymmix</i>	22
2.1.6	<i>Zusammensetzung der Medien</i>	22
2.1.6.1	Medium für die Zellkultur.....	22
2.1.7	<i>Fibrinkleber</i>	22
2.1.7.1	Materialien für Fibrinkleber.....	22
2.1.7.2	Reagenzien für Fibrinkleber.....	22
2.1.8	<i>Kapsel.....</i>	23
2.1.8.1	Materialien	23
2.1.8.2	Kapselherstellung mittels Dip/Drop Methode	23
2.1.9	<i>Agarose</i>	24
2.1.10	<i>Medium für den Ansatz des Transplantates</i>	24
2.1.11	<i>Versuchstiere.....</i>	24
2.1.11.1	Immunkompetentes Modell	24
2.1.11.2	Haltung und Fütterung der Tiere.....	24
2.1.12	<i>Medikamente</i>	24
2.1.12.1	Narkosemedikation	24
2.1.12.2	Antibiose	25
2.1.12.3	Stichprobe und Immunmodulation.....	25
2.1.12.3.1	Gruppe der immunmodulierten Tiere.....	25
2.1.12.3.2	Gruppe der nicht immunmodulierten Tiere	27
2.2	TIERMODELL	27
2.2.1	<i>Autologes Tiermodell</i>	27
2.3	METHODEN	27
2.3.1	<i>Präparation der Kaninchenohren.....</i>	27
2.3.2	<i>Gewinnung der Chondrozyten / Verdau des Knorpels.....</i>	28
2.3.3	<i>Seeding und Kultur der Zellen</i>	28
2.3.4	<i>Zellen zählen</i>	28

2.3.5	<i>Passagieren der Zellen</i>	28
2.3.6	<i>Herstellung der verschiedenen Transplantate</i>	29
2.3.6.1	Fibrin – Transplantate	29
2.3.6.1.1	Herstellung des Fibrinklebers	29
2.3.6.1.2	Herstellung der Transplantate	31
2.3.6.2	Kapsel-Vliese	31
2.3.6.3	Agarose-Vliese	32
2.3.7	<i>Implantation der Vliese</i>	32
2.3.7.1	Präoperativ	32
2.3.7.2	Narkose	32
2.3.7.3	Procedere.....	32
2.3.7.4	Tötung der Tiere.....	33
2.3.8	<i>Explantation</i>	33
2.4	HISTOLOGIE	33
2.4.1	<i>HE - Färbung</i>	34
2.4.2	<i>Van Kossa Färbung</i>	34
2.5	STATISTIK	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	MAKROSKOPIE	35
3.1.1	<i>Nicht immunmodulierte Tiere</i>	35
3.1.2	<i>Transplantate der immunmodulierten Tiere</i>	38
3.2	HISTOLOGIE	40
3.2.1	<i>Vliese, nicht immunmoduliert nach 6 Wochen in vivo</i>	41
3.2.1.1	Nativer Knorpel ohne Immunmodulation	41
3.2.1.2	Fibrin-Tx ohne Immunmodulation.....	42
3.2.1.3	Agarose-Tx ohne Immunmodulation	42
3.2.1.4	Kapsel-Tx ohne Immunmodulation	43
3.2.1.5	Zusammenfassung nicht immunmodulierte Vliese nach 6 Wochen in vivo	43
3.2.2	<i>Vliese, immunmoduliert nach 6 Wochen in vivo</i>	44
3.2.2.1	Nativer Knorpel mit Immunmodulation.....	44
3.2.2.2	Fibrin-Tx mit Immunmodulation	45
3.2.2.3	Kapsel-Tx mit Immunmodulation.....	45
3.2.2.4	Agarose-Tx mit Immunmodulation.....	46

3.2.2.5	Zusammenfassung immunmodulierte Vliese nach 6 Wochen in vivo.....	46
3.2.3	<i>Vliese, nicht immunmoduliert nach 12 Wochen in vivo</i>	47
3.2.3.1	Nativer Knorpel ohne Immunmodulation.....	47
3.2.3.2	Fibrin-Tx ohne Immunmodulation.....	48
3.2.3.3	Kapsel-Tx ohne Immunmodulation.....	49
3.2.3.4	Agarose-Tx ohne Immunmodulation.....	49
3.2.3.5	Zusammenfassung nicht immunmodulierte Vliese nach 12 Wochen in vivo.....	50
3.2.4	<i>Vliese, immunmoduliert nach 12 Wochen in vivo</i>	51
3.2.4.1	Nativer Knorpel mit Immunmodulation.....	51
3.2.4.2	Fibrin-Tx mit Immunmodulation.....	52
3.2.4.3	Kapsel-Tx mit Immunmodulation.....	53
3.2.4.4	Agarose-Tx mit Immunmodulation.....	54
3.2.4.5	Zusammenfassung immunmodulierte Vliese nach 12 Wochen in vivo.....	55
3.2.5	<i>Vliese nach 12 Wochen in vitro-Kultur</i>	56
3.2.5.1	Nativer Knorpel in vitro.....	56
3.2.5.2	Fibrin-Transplantat in vitro.....	57
3.2.5.3	Kapsel-Transplantat in vitro.....	58
3.2.5.4	Agarose in vitro.....	59
3.2.5.5	Zusammenfassung Vliese nach 12 Wochen in vitro.....	60
3.3	VERGLEICH DER VERSCHIEDENEN TRÄGERSUBSTANZEN.....	60
3.4	VERGLEICH DER ENTNAHMEZEITPUNKTE.....	60
3.4.1	<i>Nicht immunmodulierte Tiere</i>	60
3.4.2	<i>Immunmodulierte Tiere</i>	61
3.5	VERGLEICH MIT/OHNE IMMUNMODULATION.....	61
3.5.1	<i>Statistische Auswertung</i>	61
3.5.1.1	Statistischer Vergleich nach 6 Wochen.....	62
3.5.1.2	Statistischer Vergleich nach 12 Wochen.....	64
4	DISKUSSION	66
4.1	ERFAHRUNGEN IM TISSUE ENGINEERING VON CHONDROZYTEN.....	66
4.1.1	<i>Physiologische Knochenentwicklung</i>	67
4.1.2	<i>Knochenentwicklung ohne Zell – Vlies - Konstrukte</i>	67
4.2	KNOCHENBILDUNG IM TIEREXPERIMENT DER VORLIEGENDEN ARBEIT.....	67
4.3	KULTUR DER CHONDROZYTEN.....	70

4.3.1	<i>Ohr als Explantationsort</i>	70
4.3.2	<i>Temperatur</i>	70
4.3.3	<i>Differenzierung</i>	71
4.4	VERSCHIEDEN TRÄGERMATERIALIEN.....	71
4.5	IMMUNOGENE FAKTOREN BEIM MODELL	71
4.5.1	<i>Fibrinkleber</i>	71
4.5.2	<i>Vlies</i>	72
4.5.3	<i>Zellen</i>	72
4.6	WAHL DES IMMUNSUPPRESSIVUMS	72
4.6.1	<i>Warum Immunmodulation?</i>	72
4.6.2	<i>Warum Methylprednisolon?</i>	73
4.6.3	<i>Rolle von Corticoiden bei der Knochenentstehung</i>	73
4.7	HETEROTOPE TRANSPLANTATION	74
4.8	VORGÄNGE INNERHALB DES UM DAS TRANSPLANTAT LIEGENDEN GEWEBES	74
4.8.1	<i>Verhinderung des „Ag“-Ak-Kontaktes durch Immunmodulation</i>	74
4.9	TIERMODELL	74
4.10	MÖGLICHE GEFAHREN DER AUTOLOGEN TRANSPLANTATION	75
4.11	AUSBLICK	75
5	ZUSAMMENFASSUNG	77
5.1	VORGEHENSWEISE	77
5.2	ERGEBNISSE	77
5.3	SCHLUßFOLGERUNGEN	78
6	DANKSAGUNG	79
7	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	80
8	LITERATUR	81

1 Einleitung

1.1 Tissue Engineering

Im klinischen Alltag ist benötigter Gewebeersatz häufig nicht ausreichend verfügbar. Bemerkbar macht sich dies in fast allen Bereichen der Medizin: In der Dermatologie wird Haut, in den Bereichen der Hals – Nasen – Ohren Heilkunde und der plastischen Chirurgie wird Knorpel, z. B. zur Herstellung von Ohrmuscheln bei dem Krankheitsbild der Mikrotie, und Knochen bei soliden Tumoren oder im Bereich der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie benötigt. Auch interne Krankheitsbilder wie die rheumatoide Arthritis verursachen schwere Gelenkdefekte, die unter anderem operativ zu versorgen sind. Steht nicht genügend Gewebe zur Wiederherstellung zur Verfügung, wird in der Chirurgie auf inerte Materialien wie Platin, Kunststoffe o. ä. zurückgegriffen oder seltener körpereigenes Gewebe als Ersatz verwendet z. B. Magen als Speiseröhrenersatz. Eine sehr gute Alternative wird der Ersatz defekten Gewebes durch körpereigenes identisches Gewebe sein. Ein modernes und erfolgversprechendes Verfahren zur Gewebeherstellung und – vermehrung ist mit dem Tissue Engineering gegeben. Kleine Mengen Knorpels sind bereits nach ihrer Amplifizierung ausreichend für die Deckung von Gelenkdefekten. Der Bedarf an Gewebe für die plastische Chirurgie ist mit diesem Verfahren ebenso zu decken.

1.1.1 Definition des Tissue Engineering

Unter Tissue Engineering versteht man die in-vitro-Herstellung von menschlichem Gewebe. Gewebetechnologie stellt die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Technik und der Naturwissenschaften in Richtung des grundlegenden Verständnisses von Struktur- Funktionsbeziehung normaler und pathologisch veränderter Gewebe und die Entwicklung von biologischen Substituten dar, um Gewebefunktionen wiederherzustellen, aufrecht zu erhalten oder zu verbessern¹.

1.1.2 Prinzip des Tissue Engineering

Beim sog. Tissue Engineering, „TE“, wird dem Organismus im Operationssaal vitales Gewebe entnommen, gereinigt und unter Laborbedingungen in kleine Stücke geschnitten. Die Zellen werden mittels Proteasen aus ihrem Zellverbund, dem Gewebe, gelöst. Aus ursprünglich geringen Mengen vitalen Gewebes werden die gelösten Zellen isoliert und mittels eines Filters von anderen Bestandteilen des Gewebes separiert. Anschließend erfolgt die Vermehrung in Zellkulturen: Die Zellen werden durch ein ihnen angepaßtes Nährmedium in geeignetem Milieu in Kulturflaschen vermehrt. Dreidimensionale

biodegradierbare Vorlagen, sogenannte „Vliese“ oder „Scaffolds“, werden mit den kultivierten Zellen bestückt. Mit Hilfe von Trägersubstanzen und dem Vlies bleiben die Zellen in konstanter Dichte und können ein Gewebe ausbilden. Das Konstrukt kann in vitro ausreifen - d. h. neues Gewebe bildet sich durch die eingebrachten Zellen in der Kulturflasche. Das neue Gewebe kann anschließend in einen Organismus implantiert werden. Oder das Vlies – Zell – Konstrukt wird unmittelbar nach seiner Herstellung im Labor im Operationssaal in den Empfänger eingebracht und reift in dessen Organismus erst aus.

1.2 Knorpel^{2,3}

Knorpelzellen, im folgenden Text auch: „Chondrozyten“ genannt, sind in ihrer Form elliptisch, liegen in Knorpelhöhlen, umgeben von Grundsubstanz. Sie bilden isogene Gruppen von 2-4 (elastischer Knorpel) bzw. 4-8 (hyaliner Knorpel) Zellen. Die isogenen Gruppen sind aus einer Zelle entstanden. Im reifen Knorpel fehlen Nerven und Blutkapillaren. Diese enden im Perichondrium. Durch den geringen Sauerstoffgehalt muß die hohe Stoffwechselaktivität über die anaerobe Glykolyse ermöglicht werden.

1.2.1 Abstammung

Knorpelgewebe gehört zu den Binde- und Stützgeweben ebenso wie Knochen- und Chordagewebe. Chondrozyten stammen von Mesenchymzellen ab: Die Zusammenlagerung von Mesenchymzellen nennt man auch „Vorknorpel“. Wenn die Mesenchymzellen Grundsubstanz und Bindegewebsfasern abscheiden, spricht man von Chondroblasten.

1.2.2 Extrazelluläre Matrix

Die Extrazelluläre Matrix, „Interzellulärsubstanz“, besteht aus der Grundsubstanz und den Bindegewebsfasern.

1.2.2.1 Knorpelgrundsubstanz

Zur Knorpelgrundsubstanz gehören Proteoglykane, Glykoproteine und interstitielle Flüssigkeit.

1.2.2.1.1 Proteoglykane

Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Heparansulfat, Dermatansulfat und Keratansulfat sorgen als Proteoglykane für die plastische Verformbarkeit bzw. die elastische Formkonstanz. Die

Hyaluronsäure ist Hauptbestandteil der Synovialflüssigkeit der Gelenke und erhält im Glaskörper des Auges die Form. Unter den Glykosaminoglykanen ist das Chondroitinsulfat das für den Knorpelaufbau wichtigste.

1.2.2.1.2 Glykoproteine

Unter den Glykoproteinen ist das Fibronectin wichtig für die Haftung der Zellen aneinander und im Bereich der Zellkultur für die Haftung der Zellen an die entsprechenden Materialien (Kulturflaschen o. ä.).

1.2.2.1.3 Interstitielle Flüssigkeit

Zur interstitiellen Flüssigkeit gehören Plasmaproteine, Elektrolyte, Hormone und Zytokine.

1.2.2.2 *Bindegewebsfasern*

Fasern des Knorpelgewebes sind Kollagen, hauptsächlich des Typs II, und Elastin. Je nach Knorpelart zu unterschiedlichen Anteilen.

1.2.2.2.1 Kollagen

Tropokollagen wird erst extrazellulär aus von Chondrozyten sezernierten Prokollagenmolekülen gebildet und durch Quervernetzung zu Kollagen synthetisiert. Kollagen besteht größtenteils aus den Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin.

1.2.2.2.2 Elastin

Elastische Fasern sind verzweigt und bilden Netze. Die Aminosäurezusammensetzung von Elastin entspricht weitgehend der des Kollagens mit dem entscheidenden Unterschied des Vorkommens von Desmosin und Isodesmosin, die die elastischen Fasern stärken und so maßgeblich an der Elastizität beteiligt sind. Elastische Fasern sind im Gegensatz zum zugefesten Kollagen aufgrund ihrer Anordnung aus geknäuelten Elastinmoleküle zugelastisch. Histologisch gut darstellbar sind elastische Fasern mittels Orcein oder Resorcinfuchsin.

1.3 **Entzündungsreaktion**

Zu einer Entzündungsreaktion führt das Eindringen eines infektiösen Erregers, eine physikalische Schädigung oder auch das Einbringen eines Antigens. Es resultieren eine erhöhte Blutzufuhr am Ort des Geschehens, eine erhöhte Kapillarpermeabilität und die Einwanderung immunkompetenter Zellen: Leukozyten, Granulozyten und Macrophagen.

Diese Vorgänge werden von einem komplexen Zusammenspiel aus Zytokinen, Plasmaenzymsystemen, vasoaktiven Aminen und Mediatoren gesteuert. Im hier vorliegenden Versuch kann davon ausgegangen werden, daß schon das Einbringen der Transplantate eine Entzündungsreaktion hervorruft: mindestens die Scaffolds wirken als Fremdkörper.

1.4 Transplantation

In der medizinischen Literatur und der klinischen Praxis werden folgende Transplantationsarten unterschieden: die autologe, die allogene, die syngene und die xenogene Transplantation. Bei dem Transplantationsort unterscheidet man die isotope, die orthotope und die heterotope Transplantation.

1.4.1 Die autologe Transplantation

Sind Empfänger und Spender eines Transplantates gleich, spricht man von autologer Transplantation. In dem hier vorgestellten Versuch wurden Knorpelzellen von Versuchstieren autolog transplantiert, d. h. nach Entnahme und Vervielfältigung der Zellen reimplantiert.

1.4.2 Die allogene Transplantation

Eine allogene Transplantation liegt vor, wenn Empfänger und Spender genetisch differente Individuen der gleichen Spezies sind.

1.4.3 Die syngene Transplantation

Hierbei handelt es sich bei Spender und Empfänger um genetisch identische Individuen.

1.4.4 Die xenogene Transplantation

Sind Spender und Empfänger verschiedener Spezies, spricht man von xenogener Transplantation.

1.4.5 Heterotope Transplantation

Stimmt der Transplantationsort nicht mit dem Explantationsort überein, spricht man von einer heterotopen Transplantation. In diesem Versuch wurden Zellen aus dem Ohr eines Kaninchens gewonnen und die aus ihnen durch Tissue Engineering gewonnenen Transplantate auf dem Rücken des Tieres subkutan implantiert.

1.4.6 Isotope und orthotope Transplantation

Stimmt der Ort der Explantation mit dem der Transplantation überein, spricht man von orthotoper Transplantation. Ist das transplantierte Gewebe auch noch identisch mit dem explantierten, spricht man von isotoper Transplantation.

1.5 Immunologische Geschehen bei Transplantat-Empfängern

Bei genetisch nichtidentischen Individuen kommt es im Rahmen der Host-versus-graft-Reaktion bei einem allogenen Transplantat zur Abstoßung. Dies passiert in Abhängigkeit der Histokompatibilität, die zellulär als Major Histocompatibility Complex, „MHC“, repräsentiert ist. Von zentraler Bedeutung bei dieser Abstoßungsreaktion sind T-Zellen, die vom Thymus geprägten Lymphozyten. Von Ihrer Aktivität sind B-Zellen und Macrophagen abhängig. T-Helferzellen erkennen mit Ihrem T-Zell-Rezeptor von Transplantatzellen oder Antigenpräsentierenden Zellen des Host präsentierte MHC-Antigene und auch „Minor“-Antigene. Sie aktivieren über die Interleukine Il-2 und IFN γ zytotoxische T-Zellen, über Il-2, Il-4 und Il-5 B-Zellen. TNFbeta und IFN γ fungieren als Macrophagen aktivierender Faktor. Aus der Aktivierung resultieren die zellvermittelte Zytotoxizität (zytotoxische T-Zellen), die antikörperabhängige Zytotoxizität, lytische Schäden und Gefäßverschlüsse (Antikörper + Komplementsystem) die Abräumung durch Macrophagen.⁴

1.5.1 Abstoßungsreaktionen und ihre Charakteristika

Klinisch wird der Typ der Abstoßung nach der Geschwindigkeit der Reaktion klassifiziert.

1.5.1.1 Akute Abstoßung

Die akute Abstoßung dauert Tage-Wochen. Es handelt sich hierbei um die oben beschriebene primäre Aktivierung von T-Zellen.

1.5.1.2 Andere Formen der Abstoßung

Die hyperakute (Minuten-Stunden, präformierte Anti-Spender-Antikörper und Komplement), die beschleunigte (Tage, Reaktivierung sensibilisierter T-Zellen) und die chronische Abstoßung (Monate-Jahre, vermutlich Antikörper, Immunkomplexe, zelluläre Reaktionen) sind weitere vorkommende Abstoßungsreaktionen.

1.6 Medikamentöse Immunsuppression

Bei der klassischen allogenen Transplantation finden folgende Gruppen von Immunsuppressiva Anwendung: Steroide, Ciclosporin und Azathioprin. Ciclosporin greift in die Lymphokinproduktion ein, Azathioprin verhindert die Proliferation aktivierter T-Zellen und Steroide wirken antiphlogistisch und unterdrücken aktivierte Makrophagen. Da Ciclosporin und Azathioprin ihre Wirkung erst entfalten, wenn die fremden Zellen präsentiert werden und in meinem Versuch eine weitgehend ungestörte Ausbildung des Gewebes durch die implantierten Zellen nötig war, kam ein Glucocorticoid zur Anwendung – eines der wenigen Medikamente, die bereits eine entzündliche Reaktion von Beginn an unterdrücken.

1.7 Glucocorticoide

1.7.1 Wirkungen von Cortisol auf den Organismus

Die physiologischerweise von der Zona fasciculata der Nebennierenrinde sezernierten Glucocorticoide haben mannigfaltige systemische Wirkungen: Sie wirken am Herzen positiv inotrop, erhöhen an den Gefäßen die Ansprechbarkeit für Noradrenalin, schaffen eine katabole Stoffwechselsituation – Lipolyse und Proteolyse sind erhöht –, senken am Magen den Prostaglandin vermittelten Schleimhautschutz, senken an der Niere die Glucosetoleranz und erhöhen dort die Calcium – Phosphat – Ausscheidung, fördern in der Leber die Gluconeogenese, die Glycogen- und Proteinsynthese. Am Zentralen Nervensystem führen Glucocorticoide zu einer Erregungssteigerung. Am Knochen bewirken sie durch Proteolyse langfristig eine Osteoporose.

1.7.2 Wirkungen des Cortisols in pharmakologischer Dosis

Cortisol verringert früh die Wirkung freigesetzter Mediatoren wie Histamin und Serotonin und verringert Kapillardilatation und Ödembildung, Leukozytenmigration sowie Fibrinablagerung im entzündeten Gewebe. Entzündungsvermittelnde Faktoren werden vermindert bzw. in ihrer Wirkung abgeschwächt: Über die Erhöhung von Lipocortin verringert es die Sekretion von Prostaglandinen und Thromboxanen. Die glucocorticoid vermittelte Verringerung der Phospholipase A₂ führt zur Reduktion von Prostaglandinen und Leukotrienen.

Spät sorgt Cortisol in T – Lymphozyten für eine Verringerung der Mediatorenfreisetzung, ihrer Proliferation und ihrer Toxizität.

Im Blut finden sich weniger zirkulierende Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile und Basophile.

Im Entzündungsgebiet selbst können weniger Makrophagen und Neutrophile beobachtet werden.

In therapeutischer Dosierung stabilisiert Cortisol die Lysosomenmembran und verringert über weniger lysosmale Enzyme auch die Leukozyten- und Mastzellmigration ins Gewebe.

Die antiphlogistische Wirkung, die Störung der Wirkung antigenpräsentierender Zellen (APC) und die Reduktion der Expression von MHC-Molekülen machen Glucocorticoide in therapeutischer Dosis zu einem potenten Mittel zur Sicherung von Allotransplantaten.

1.7.3 Methylprednisolon

Die antiphlogistische Wirkung pharmazeutischer Präparate ist umso größer, je stärker die glucocorticoide Wirkung ist. Man spricht von relativer glucocorticoider bzw. relativer mineralocorticoider Wirkung. Die über mehrere Wochen lang eingenommene Dosis, die die Symptome eines Cushing – Syndroms auslöst, nennt man Cushing – Schwellendosis.

Tabelle 1: Dosis und Wirkung von Corticoiden

	rel. glucocorticoide Wirkung	rel. mineralocorticoide Wirkung (Na- u. K- Ausscheidung)	Cushing Schwellendosis –
Cortisol	1	1	30 mg
Methylprednisolon	5-6	0,8	6 mg

Um eine ausreichende antiphlogistische Wirkung in diesem Experiment zu erzielen, wurde Methylprednisolon dem Cortisol vorgezogen.

1.8 Ergebnisse bisheriger Versuche

Bisherige Versuche der Arbeitsgruppe Haisch und Sittinger haben gezeigt, daß mit rein allogenen Transplantaten keine befriedigenden Ergebnisse in bezug auf die Formstabilität und die Abstoßung der Implantate zu erzielen waren. So unterlagen selbst Transplantate, die von Zellen aus inzüchtigen Geschwistertieren (Neu Seeland Kaninchen) gewonnen und über das Tissue Engineering kultiviert wurden, lymphozytärer Infiltration und massiver Resorption. Es erschien daher notwendig, die Zellen autolog zu gewinnen und eine zusätzliche medikamentöse Abschirmung zu gewährleisten.

1.9 Ziele der Arbeit

Diese Dissertation soll

- die Reaktion des Empfängers autologer TE-Transplantate untersuchen,
- zeigen, daß die Transplantate in den immunmodulierten Tieren einen Vorteil hinsichtlich der Immunreaktion des Empfängers haben bezogen auf die Gruppe der unbehandelten Kaninchen.
- belegen, daß sich zu unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten – nach 6 und nach 12 Wochen - die Gewebe unterschiedlich ausgebildet haben bzw. ausgereift sind.

1.10 Versuchsablauf

In dieser Arbeit wurde die Methode des Tissue Engineering angewendet, um aus isolierten Chondrozyten Implantate herzustellen. Die Chondrocyten wurden aus dem elastischen Knorpel von Kaninchenohren gewonnen, wobei je Kaninchen ein Referenzstück nativen Knorpels von 1 cm² unbehandelt in vitro weiterernährt wurde. Die Knorpelzellen wurden anschließend kultiviert und 2 x passagiert. Als Passage wird die Lösung der kultivierten Zellen von der Kulturflasche und die erneute Aussaat verstanden. Fibrinkleber und Agarose wurden hergestellt. Die amplifzierten Chondrocyten wurden geerntet und mit den Medien Fibrinkleber und Agarose in Suspension gebracht. Dieser Suspension wurden noch weitere Stoffe zugesetzt, die Zellen zur Ausbildung von Gewebe benötigen wie z. B. Vit C. Anschließend erfolgte die Bestückung der Scaffolds mit diesem Zell – Medium – Gemisch. Ein Teil der so entstandenen Transplantate wurde zusätzlich mit einer Polyelectrolyt – Kapsel versehen. Bis auf die in vitro Kontrollen wurden alle Transplantate Kaninchen implantiert und nach 6 bzw. 12 Wochen wieder explantiert. Anschließend erfolgte die histologische Untersuchung.

1.11 Versuchsablaufplan

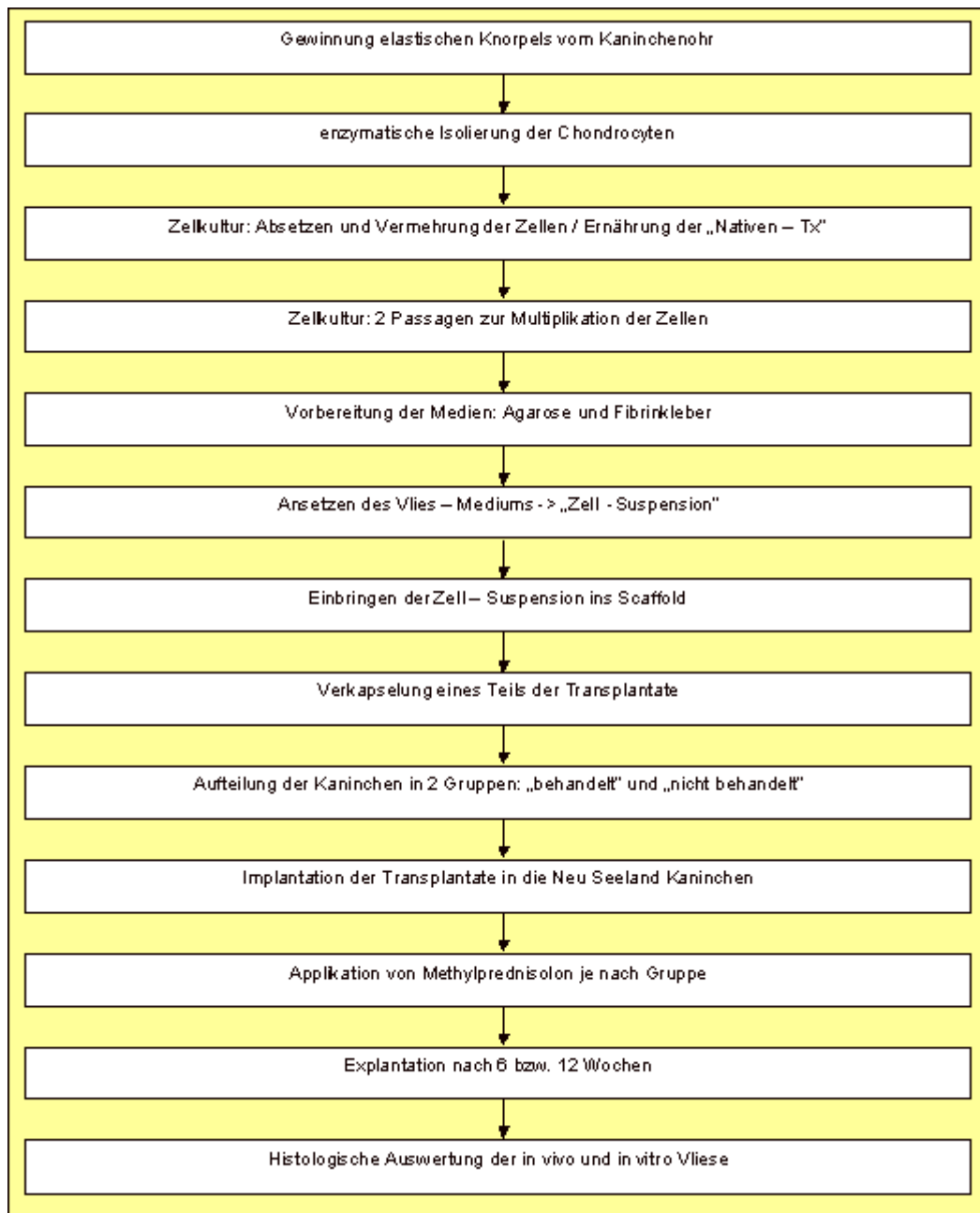


Abbildung 1: Flußdiagramm des Versuchsablaufes

2 Material, Tiermodell und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

CO₂-Begasungsbrutschrank, Heraeus, Osterode

Zentrifuge, Beckman GS-6R-Centrifuge

Laminar-Flow-Bank, antair BSK

Mikroskop, Leica Typ DMIL

Wärmekammer, Heraeus, Osterode

Skalpelle, Bard Parker, Becton Dickson

Spinnerflaschen, Wheaton, USA

Magnetrührer, Variomac H+P Labortechniksystem München

Nylonnetz(250µm), Reichelt Chemietechnik, Heidelberg

Hämozytometer, Neubauer Feinoptik, Bad Blankenburg

Falcon Röhrchen(50ml), Falcon, Heidelberg

Serologische Pipetten, Falcon, Heidelberg

24 well Platte, Falcon, Heidelberg

Petrischalen, Cellstar, Greiner Labortechnik, Nürtingen

Nahtmaterial, Seralon, Ethicon, Hamburg

Pipettierhilfe, Accu-jet, Brand, Wertheim

Gewebekulturflaschen, Nunc, Brand Products

Einmal-Spritzen, Braun Melsungen

Einmal-Kanülen, Braun Melsungen

Einmal-Spritzenvorsatzfilter, Schleicher und Schuell

Sterile Spitzen, Eppendorf

Handschuhe, Mikrotouch, Johnson & Johnson, USA

Vliese (Scaffolds): Ethisorb H510 (Chargennummer 1 FO1280) 10x10 mm d=2mm,

Ethicon, Hamburg

2.1.2 Scaffold

Als Trägersubstanzen, sog.: „Scaffolds“, dienten Polyglycolsäure-polylactat – Vliese der Fa. Ethicon®. Ihre dreidimensionale Struktur erlaubt die Anheftung von Zellen. Sie sorgt dafür, daß die Zellen gleichmäßig verteilt bleiben: Die Scaffolds wurden mit einer Chondrozyten – Fibrinkleber bzw. Chondrozyten – Agarose Suspension versehen. Ohne

dieses Trägermaterial, würden die Zellen der Schwerkraft entsprechend in größter Konzentration am Boden des Tranplantats zu finden sein.

2.1.3 Rohmedien

HANK's Salt Solution (1x) w/o Ca^{++} , Mg^{++} , w Phenol red, Seromed Biochrom KG Berlin
 Ham's F-12 Medium (1x), w 10mg/l Phenol red, w 1,176 g/l NaHCO_3 , w/o L-Glutamine, Seromed Biochrom KG Berlin

2.1.4 Reagenzien und Lösungen

PBS-Dulbecco, Seromed Biochrom KG Berlin

Trypsin/EDTA (10x) 0,5/0,2 % (w/v) in 10x PBS w/o Ca^{++} , Mg^{++} , Seromed Biochrom KG Berlin

Ascorbinsäure (fest), Merck, Darmstadt

Trypanblau (0,2%), Chroma-Gesellschaft, Schmid GMBH+CO Köngen IN.

96% Ethanol, Merck, Darmstadt

Nystatin (fest), Seromed Biochrom KG Berlin

Rabbit Serum, Kraeber, Deutschland

Collagenase P, Boeringer, Mannheim

Collagenase II, Seromed, Biochrom KG Berlin

Hyaluronidase (fest), Roth, Karlsruhe

L-Prolin, Sigma Cellculture, St. Louis USA

Hepes (1M), Seromed Biochrom KG Berlin

Penicillin/Streptomycin, Seromed Biochrom KG Berlin

NaCl (0,9%), Braun, Melsungen

L-Glutamin (200mM), Seromed Biochrom KG Berlin

Ketanest (50 mg/ml), Parke-Davis, Berlin

Rhompun (2%), Bayer, Leverkusen

Braunol, B. Braun, Melsungen

2.1.5 Enzymmix

30ml RPMI-Medium + 10% Rabbit Serum + P/S

1mg/ml Collagenase P

0,1mg/ml Hyaluronidase

0,1mg/ml Collagenase II

2.1.6 Zusammensetzung der Medien

2.1.6.1 Medium für die Zellkultur

RPMI-Medium 1640 (1x) mit

10% (50 ml) Rabbit Serum: das Kaninchenserum wurde zuvor 30 min. bei 56°C inaktiviert.

5ml Penicillin/Streptomycin

Nystatin (Spatelspitze)

2.1.7 Fibrinkleber

2.1.7.1 Materialien für Fibrinkleber

Kühlzentrifuge, Eppendorf

2 Glassäulen mit Glasfritte

2 Glasflaschen (500 ml), Schott

1 Stativ, Roth

2 Muffen, Roth

2 Klemmen, Roth

Skalpell, Bard-Parker

50 ml Zentrifugen-Röhrchen, Falcon

2.1.7.2 Reagenzien für Fibrinkleber

Sephadex A50, Pharmacia Biotech

Sephadex G25, Sigma

Lösung 1: 0,075 mol/l NaCl, Aqua inject., Apotheke der Charité

Waschpuffer: 0,015mol/l Tri-Natriumcitrat ($\text{Na}_3[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7] \times 2\text{H}_2\text{O}$), Aqua inject. 0,2 mol/l, NaCl, Aqua inject., Apotheke der Charité

Elutionspuffer: 0,015M Tri-Natriumacetat ($\text{Na}_3[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7] \times 2\text{H}_2\text{O}$), Aqua inject.

2mol/l NaCl, Aqua inject., Apotheke der Charité

Kaninchen Plasma, Kraeber

1mol/l CaCl₂, Aqua inject., Apotheke der Charité

Rekombinantes Thromboplastin

2.1.8 Kapsel

Unter Verwendung einer ausgewählten Kombination aus Polyanionen und Polykationen bilden sich bei bestimmten äußeren Bedingungen (pH-Wert und Temperatur) Polyelektrolytkomplexe aus.⁵ Bei Kontakt der Polyanionen und Polykationen in wäßrigen Lösungen entstehen membranartige Strukturen. Die Stoffkombination aus Natriumcellulose- sulfat (NaCS) und Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) erscheint in diesem Zusammenhang bezüglich ihrer physikomechanischen Eigenschaften hervorragend⁶. Inzwischen ist ein Verkapselungssystem entstanden, das den verschiedenen Anforderungen zu verkapselnder biologischer Zellen oder Zellprodukte entsprechend (Antikörper⁷, Hepatozyten^{8,9}, Bakterien¹⁰) angewendet werden konnte. Die Makroverkapselung eines komplexen Gewebes wie Knorpel wurde erstmals erfolgreich von Haisch und Gröger durchgeführt⁴⁶. Gemäß deren Vorgehen ist sie in der vorliegenden Arbeit eingesetzt worden.

2.1.8.1 Materialien

Polyethylenglykol-Lsg., Flukachemie, Deutschland

NaCS, MI 7-Lösung, Laborproduktion Universität Potsdam

PDADMAC, B40-Lösung, Bitterfeld

2.1.8.2 Kapselherstellung mittels Dip/Drop Methode

Verwendung fanden PDADMAC(4,0%) und NaCS (2,5%). Bei einem pH-Wert von 8,2 wurde NaCS autoklaviert und PDADMAC steril filtriert. Die Transplantatoberfläche wurde gleichmäßig mit der Natriumcellulosesulfat- Lösung benetzt, so daß diese das Transplantat vollständig umschlossen hatte. Danach wurde das Transplantat in ein Fällbad mit PDADMAC gelegt. Nach 120 Minuten war die Kapselbildung abgeschlossen und das verkapselte Transplantat wurde in das Vlies-Medium überführt.

2.1.9 Agarose

Agarose Type IX Ultra low gelling temperature von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim. Die Agarose wurde entsprechend den Vorschriften des Herstellers hergestellt.

2.1.10 Medium für den Ansatz des Transplantates

Ham's F12-Medium mit

5% (25 ml) Rabbit Serum (inaktiviert 56°C, 30min)

Prolin 70mg/l

Glutamin 10 ml/500ml (steril filtriert)

5 ml Penicillin/Streptomycin auf 500 ml

5 ml Hepes/500 ml

5 ml Ascorbinsäure

2.1.11 Versuchstiere

2.1.11.1 Immunkompetentes Modell

Bisherige Tierversuche im Bereich Tissue Engineering wurden überwiegend an immuninkompetenten Tieren wie der athymischen Nacktmaus durchgeführt. Um aufzuzeigen, auf welche Schwierigkeiten man stoßen kann und welche Probleme lösbar sind, wurden hier immunkompetente Neuseeland-Kaninchen verwendet.

2.1.11.2 Haltung und Fütterung der Tiere

Um die Haltung und Fütterung der Tiere sorgten sich die Mitarbeiter der „Tierexperimentelle Einrichtung der Charité“.

2.1.12 Medikamente

Zur Immunmodulation wurde Methylprednisolon (Urbason 16[®]) verwendet. Das Urbason 16[®] wurde intramuskulär verabreicht.

2.1.12.1 Narkosemedikation

Die Narkose der Tiere erfolgte durch den Tierarzt: intramuskuläre Applikation von Xylazinhydrochlorid (Rhompun[®]) 0,3ml und 0,5ml Ketamin (Ketanest[®]) pro kg Körpergewicht.

2.1.12.2 Antibiose

Perioperativ wurden die Tiere durch Tardomyocel® abgeschirmt. 1. Gabe: 0,1ml/kg Körpergewicht am Tag der Operation, 2. Gabe: am 2. postoperativen Tag.

2.1.12.3 Stichprobe und Immunmodulation

Die Stichprobe der Kaninchen wurde nach der Zufallsauswahl durchgeführt und in zwei Gruppen eingeteilt: die eine Gruppe hat eine Immunmodulation erfahren, die andere nicht.

2.1.12.3.1 Gruppe der immunmodulierten Tiere

Um das Transplantat perioperativ zu schützen, wurde lokal Lederlon® appliziert. Vor Einbringen der Transplantate wurden diese mit Lederlon® (1 ml Kristallsuspension Triamcinolonhexacetonid auf 10 ml NaCl verdünnt) benetzt. Die systemische Immunmodulation erfolgte durch intramuskuläre Gabe von Methylprednisolon (Urbason 16®) nach folgendem Schema:

Tabelle 2: Der Gruppe der immunmodulierten Tiere applizierte Dosen

	Dosis in mg/kg Körpergewicht
Tag	
1	1,00
2	1,00
3	1,00
4	1,00
5	0,75
6	0,75
7	0,75
8	0,75
9	0,50
10	0,50
11	0,50
12	0,50
13	0,25
14	0,25
15	0,25
16	0,25
17	0,10
18	0,10
19	0,10
20	0,10

2.1.12.3.2 Gruppe der nicht immunmodulierten Tiere

Die Tiere dieser Gruppe erhielten keine intramuskuläre Gabe eines Corticoids oder eine andere Form der Immunmodulation. Auch wurden die Transplantate bei Implantation nicht mit Lederlon® benetzt.

2.2 Tiermodell

Daß Knorpel aus Tissue Engineering - Transplantaten mit isolierten Chondrozyten in vitro¹¹ und in vivo^{12,13,14} entsteht, wurde bereits beschrieben. Als Tiermodell dienten Neuseeland-Kaninchen. Die Arbeitsgruppe Haisch / Sittinger der Charité hatte in Vorversuchen Erfahrungen mit diesen Tieren sammeln können. Die verwendeten Tiere waren immunkompetent. Aus dem oberen Teil jeweils eines Ohres der Kaninchen wurden Knorpelzellen isoliert.

2.2.1 Autologes Tiermodell

Das Tiermodell wurde autolog gewählt, um möglichst viele immunologische Reaktionen, wie sie bei Xeno- und Allotransplantationen vorkommen, auszuschließen. Bislang gemachte Erfahrungen der Arbeitsgruppe Haisch / Sittinger mit Transplantationen bei immunkompetenten inzüchtigen Geschwistertieren wurden berücksichtigt.

2.3 Methoden

2.3.1 Präparation der Kaninchenohren

Die erste operative Phase diente der Gewinnung elastischen Knorpelgewebes. Die Kaninchen wurden wie unter 2.1.12.1 beschrieben zur Operation vorbereitet. Zusätzlich erhielten Sie eine Infiltrationsanästhesie von jeweils 2ml 2%igem Lidocain um das Cavum conchae. Das Ohr wurde oberhalb des Cavum conchae abgesetzt, weit entfernt von der äußerst schmerzempfindlichen Knorpel-Knochen-Grenze. Das teilweise ablatierte Ohr wurde mit sterilem Wasser gereinigt und von HAM's Medium umgeben direkt ins Labor transportiert. Dort wurden mit einem Skalpell Cutis und Perichondrium präpariert und das Knorpelgewebe freigelegt. Der so gewonnene elastische Knorpel ohne Perichondrium wurde mit 70%igem Ethanol gereinigt und mehrfach mit PBS (Dulbecco Biochrom KG Cat. No. L 1825) gespült, anschließend in eine mit Medium gefüllte Petri – Schale überführt. Mit dem Skalpell wurde der Knorpel zu Stücken von etwa 3mm x 3mm zerkleinert und anschließend in eine autoklavierte Spinnerflasche überführt.

2.3.2 Gewinnung der Chondrozyten / Verdau des Knorpels

In die Spinnerflasche wurde der beschriebene Enzymmix gegeben. Auf einen Magnetrührer gestellt, erfolgte der enzymatische Verdau über 18 h im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5%. Anschließend wurde die Suspension durch das Nylonnetz in Falcon - Röhrchen überführt. Diese wurden 5 min lang bei 1800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in HANKS's Lösung resuspendiert. Der genannte Vorgang wurde sooft wiederholt, bis der Überstand klar war. Die Resuspension des letzten Pellets erfolgte mit 5 ml RPMI – Medium. Anschließend wurde die Vitalität anhand der Trypanblau-Methode bestimmt und die Zellzahl ermittelt.

2.3.3 Seeding und Kultur der Zellen

Jeweils eine Anzahl von 5 Mio. Zellen wurde mit 25ml RPMI-Medium suspendiert und in Kulturflaschen (175ml Nunc®) ausgesät. Die Flaschen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Gasaustausch mit der Umgebung wurde durch 1/2 Drehung des Deckels der Flasche ermöglicht. Alle 2 Tage wurden 3/4 des Mediums gewechselt, um so einerseits der Übersäuerung des Mediums vorzubeugen und andererseits einige der von den Chondrozyten produzierten Wachstumsfaktoren und Botenstoffe in der Kulturflasche zu belassen.

2.3.4 Zellen zählen

20µl der Chondrozyten-RPMI-Suspension wurden in einem Eppendorf®-Gefäß mit 20µl Trypanblau verdünnt und gefärbt. Die Anzahl der Zellen wurde in der Neubauer-Zählkammer nach folgender Formel entwickelt: Anzahl der in 16 Feldern vorhandenen Zellen x multipliziert mit der Verdünnung durch das RPMI-Medium (Faktor 10), der Verdünnung durch das Trypanblau (Faktor 2) und der durch die technischen Vorgaben der Neubauer-Zählkammer bedingten Konstanten 10⁴: $x * 2 * 10 * 10^4$.

2.3.5 Passagieren der Zellen

Das Medium in der Kulturflasche wurde mit einer Pipette abgesaugt und die adhärenen Zellen mit PBS gespült. Trypsin/EDTA- Lösung wurde zur Lösung des Zellverbandes in die Kulturflasche gegeben. Diese blieb 5 min im Brutschrank. Unter dem Mikroskop konnte jetzt die Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche beobachtet werden. Sollten sich nicht alle Zellen vom Boden gelöst haben, wurde dies durch leichtes Klopfen

erreicht. Die Trypsinierung wurde nun sofort mit einer entsprechenden Menge RPMI-Medium 10% Rabbit Serum + P/S gestoppt und der Inhalt der Flasche mittels einer Pipette homogenisiert und in ein Röhrchen zur Zentrifugation überführt. Diese erfolgt bei 1800 U/min und 25-30°C.

Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren abpipettiert und das Pellet in 5 ml RPMI-Medium resuspendiert, um die Zellzahl zu bestimmen. Die Zellen wurden entsprechend auf neue Kulturflaschen verteilt. Sie wurden 2 x passagiert, bis sie in eine Vlieskultur eingebracht wurden. Pro Kulturflasche erhielt man bis zu 10×10^6 Zellen.

2.3.6 Herstellung der verschiedenen Transplantate

Insgesamt wurden je Versuchstier 14 Transplantate hergestellt. Das ergibt bei 6 Versuchstieren die Summe $n=84$ Transplantate. Da ein Kaninchen eine Woche nach der Materialgewinnung wegen einer schweren Diarrhoe tierärztlich indiziert eingeschläfert werden mußte, liefen 14 Transplantate als in vitro Kontrolle.

2.3.6.1 Fibrin – Transplantate

Zur Herstellung benötigte ich die kultivierten Chondrocyten und Fibrinkleber.

2.3.6.1.1 Herstellung des Fibrinklebers

2.3.6.1.1.1 Ansetzen der Chromatographie-Gele

Sephadex A-50

Pro 100ml Plasma wurden 4 ml gequollenenes Sephadex A-50 benötigt

1g Trockensubstanz Sephadex A-50 ergibt etwa 25 ml Bettvolumen

Sephadex A-50 wurde mit 0,075 mol/l NaCl-Lösung in einer Schottflasche über 12h bei 4°C zum Quellen gebracht und anschließend autoklaviert.

Sephadex G-25

Pro 100ml wurden 2ml gequollenes Sephadex G-25 benötigt

1g Trockensubstanz Sephadex G-25 ergibt etwa 4-6ml Bettvolumen

Sephadex G-25 wurden mit 0,075mol/l NaCl Lösung für 12h zum gebracht und anschließend autoklaviert.

2.3.6.1.1.2 Fibrinogengewinnung

Als Ausgangsmaterial diente Kraeber rabbit plasma, tiefgefroren.

Die Plasmaflaschen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, das Plasma in 50 ml Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden bei –70°C (mind. 45min) eingefroren. Das in den Röhrchen gefrorene Plasma wurde bei 4°C über 12h langsam wieder aufgetaut. Der weiße flockige Niederschlag (präzipitiertes Fibrinogen) wurde in der Kühlzentrifuge bei 4°C, 20min, 3210xg abzentrifugiert, der Überstand mit einer sterilen Pipette abgenommen und das Restplasma in einer Schottflasche gesammelt. Anschließend wurde das ausgefallene Fibrinogen im Wasserbad bei 37°C erwärmt bis sich das Fibrinogen wieder vollständig verflüssigt hatte.

Die einzelnen Fibrinogenfraktionen wurden mit einer Eppendorfpipette (5ml) in einem Röhrchen vereinigt und mittels mehrmaligem Aufziehen und Ablassen homogenisiert. Zuletzt wurde die Fibrinogenfraktion in sterile Spritzen aufgezogen, die Lagerung erfolgte bei –20° C.

2.3.6.1.1.3 Thrombingewinnung

Die Schottflasche mit dem Plasmaüberstand aus der Fibrinogengewinnung wurde auf 25°C vorgewärmt. Pro 100ml Plasma wurde 4ml gequollenes Sephadex A-50 in die Schottflasche pipettiert. Bei Raumtemperatur wurde das Plasma mit Sephadex A-25 für 20min in einem Schüttelbad inkubiert.

Anschließend wurde die Flasche 10min stehen gelassen, damit sich das Sephadex am Boden der Flasche absetzen konnte. Der Plasmaüberstand wurde abpipettiert und in einer zweiten sterilen Schottflasche gesammelt, dabei ca. 3mm Plasma über dem Sephadex stehen gelassen. Pro 100 ml eingesetztem Plasma wurde 7,5 ml Waschpuffer in die Schottflasche mit dem Sephadex pipettiert. 2 Glassäulen mit Muffen und Klemmen wurden an einem Stativ befestigt und senkrecht ausgerichtet, der Hahn geschlossen. Die Säule wurde mit der Sephadex A50 Fraktion beladen (luftblasenfrei) und der Hahn geöffnet. Erneut wurde Waschpuffer auf die Säule gegeben (5ml). Die Elution des Prothrombinkomplexes erfolgte mit Elutionspuffer (3ml pro 100 ml eingesetztem Plasma). Der eluierte Prothrombinkomplex wurde in einem Röhrchen auf Eis aufgefangen.

Anschließend erfolgte die im folgenden beschriebene Entsalzung.

2.3.6.1.1.4 Entsalzung

Die Entsalzung erfolgte mittels Gel-Elutionschromatographie. Die 2. Glassäule wurde mit Sephadex G25 beladen. Das Eluat (Prothrombinkomplex) wurde auf die Säule aufgetragen. Der entsalzte Prothrombinkomplex wurde in einem Röhrchen auf Eis aufgefangen.

2.3.6.1.1.5 Aktivierung des Prothrombins

Pro ml Prothrombinkomplex wurde mit der Eppendorffpipette 20µl einer 1mol/l CaCl_2 Lösung hinzugefügt (Endkonzentration 20mMol/L). Pro ml Prothrombinkomplex wurde mit der Eppendorffpipette 50µl Thromboplastin hinzugefügt.

2.3.6.1.2 Herstellung der Transplantate

Die Zellen wurden trypsiniert und gezählt. Zur Herstellung der Transplantate wurde eine Konzentration von 30 Mio. Zellen/ml verwendet. Bei einem Vlies mit einer Größe von 1cm² und einer Dicke von 2mm ergibt sich ein Volumen des Vlieses von 200µl. Es wurde also eine Zellzahl von 6 Mio. Zellen pro Vlies benötigt. Diese 6 Mio. Zellen wurden mit Fibrinogen im Verhältnis 3:1 gemischt (Gesamtvolumen 200µl). Die Zellen wurden in 133µl Vlies-Medium aufgenommen und homogenisiert. Anschließend wurden 66µl Fibrinogen zugegeben und die Suspension erneut homogenisiert. Dann wurden die 200µl in das Vlies gegeben und ca. 40µl Thrombin (1:10 mit PBS verdünnt) aufgetropft. Da das Thrombin nur zur Polymerisation des Fibrinogens dient, braucht es nicht zum Gesamtvolumen der Vliese gerechnet werden. Zum Auspolymerisieren wurden die Vliese bei 37° C in den Brutschrank gegeben.

Insgesamt wurden 8 Fibrintransplantate dieser Art pro Kaninchen hergestellt.

2.3.6.2 Kapsel-Vliese

Entsprechend der Vorgehensweise von Haisch und Gröger⁴⁶ wurden 4 der 8 Fibrin-Transplantate pro Kaninchen im Anschluß an ihre Herstellung mit einer Polyelektrolyt-Kapsel versehen.

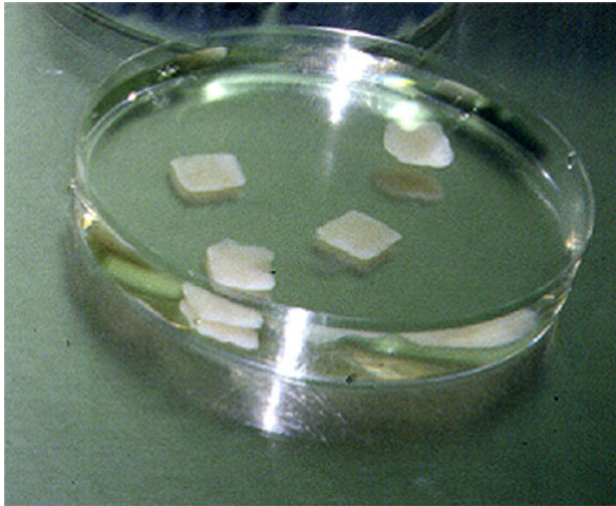


Abbildung 2: Transplantate nach dem Verkapseln

2.3.6.3 Agarose-Vliese

Die Agarose kühlte bei Raumtemperatur auf 37° C ab. In gleicher Konzentration wie bei den Fibrin-Vliesen wurden dann Chondrocyten hinzugegeben. Das Volumen pro Vlies betrug 200µl bei einer Konzentration von 30 Mio. Zellen/ml.

2.3.7 Implantation der Vliese

2.3.7.1 Präoperativ

Einen Tag vor der Operation wurde den Kaninchen eine ca. 20 cm x 10 cm große Fläche auf dem Rücken rasiert.

2.3.7.2 Narkose

Die Kaninchen wurden wie unter 2.1.12.1 beschrieben zur Operation vorbereitet.

2.3.7.3 Procedere

Entlang von 3 paramedianen Reihen wurden jeweils in 2 Reihen jeweils 4 Incisionen vorgenommen, in einer Reihe 2 Incisionen. Unterhalb der Incisionen wurde auf der Muskelfaszie stumpf ein Areal von etwa 1,5 cm x 1,5 cm präpariert. Anschließend wurden die vorbereiteten verschiedenen Transplantate eingelegt.

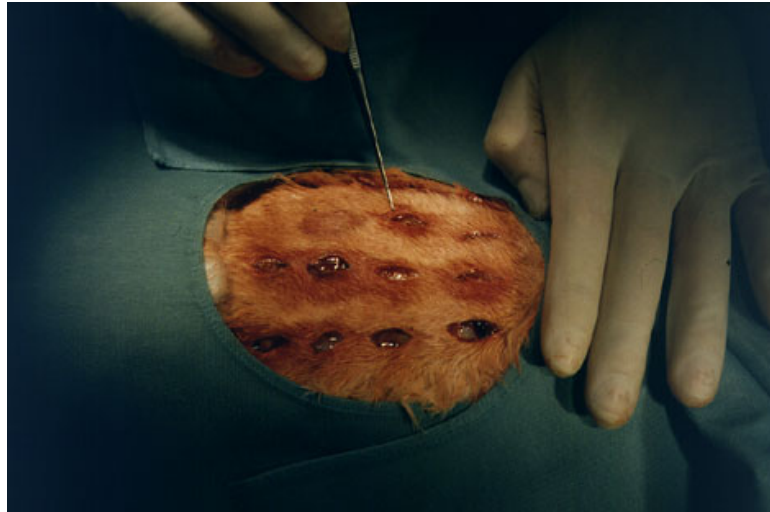


Abbildung 3: Kaninchenrücken bei der Implantation: in den Taschen kann man weißlich schimmernd die Transplantate erkennen

Der Wundverschluß erfolgte jeweils mittels zweier Subkutan-Nähte und einer Hautnaht.

2.3.7.4 Tötung der Tiere

Die Tötung der Tiere erfolgte mit Kalium-Lösung durch den Tierarzt. 1 Tier mußte vor der Implantation der Transplantate tierärztlich indiziert eingeschláfert werden. 2 der 5 Tiere wurden nach 6 Wochen, die letzten 3 Tiere nach 12 Wochen getötet.

2.3.8 Explantation

Direkt im Anschluß an die Tötung der Tiere erfolgte die Explantation der Vliese. Entsprechend der während der Implantation angefertigten Skizzen der verschiedenen Transplantat - Typen wurden sie aus den subkutanen Taschen mit einem Skalpell entfernt. Dann wurden die Transplantate in 24 - Well - Platten in Nährmedium eingelegt und ins Labor transportiert.

2.4 Histologie

Die histologische Auswertung erfolgte nach einer der aussagekräftigsten und gebräuchlichsten Färbungen: Hämatoxilin – Eosin, HE. Zur anschaulicheren Darstellung von Verkalkungen kam die Van Kossa Färbung zur Anwendung. Der Vergleichbarkeit halber wurden die histologischen Schnitte in gleicher ursprünglicher Vergrößerung photographiert.

2.4.1 HE - Färbung

Bei der Haematoxylin – Eosin – Färbung färbt sich der Zellkern blau, das Plasma gewöhnlicherweise rosa und Verkalkungen dunkel – violett. Knochengewebe sieht verglichen mit Knorpel dunkel – violett aus.

2.4.2 Van Kossa Färbung

In der Van Kossa Färbung werden Verkalkungen besonders hervorgehoben: sie markieren sich schwarz, im Doppelkontrast braun – silbrig.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS 10.0 vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Makroskopie

3.1.1 Nicht immunmodulierte Tiere

Nach 6 Wochen in vivo konnten von 14 eingepflanzten Transplantaten 14 wieder entnommen werden. Sie waren von fester Konsistenz und von gleichem Ausmaß wie bei der Implantation:

1 cm x 1 cm x 0,2 cm. Eine Ausnahme stellten auch hier die Kapsel-Transplantate dar: sie unterlagen einer Schrumpfung.



Abbildung 4: native Transplantate nach 6 Wochen in vivo, nicht immunmoduliert



Abbildung 5: Fibrin-Transplantate nach 6 Wochen in vivo, nicht immunmoduliert

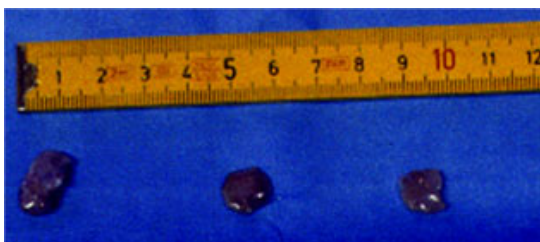


Abbildung 6: Kapsel-Transplantate nach 6 Wochen in vivo, nicht immunmoduliert

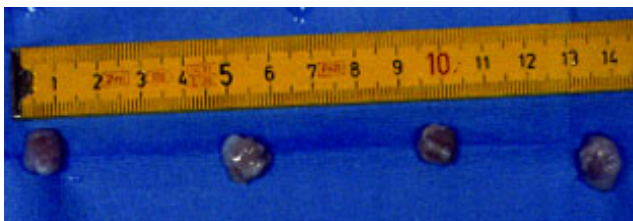


Abbildung 7: Agarose-Transplantate nach 6 Wochen in vivo, nicht immunmoduliert

Nach 12 Wochen waren die Implantationsstellen in den nicht immunmodulierten Tieren nur noch schwer oder nur anhand der verstärkten petechialen Blutungen und vaskulärer Infiltration zu erkennen.

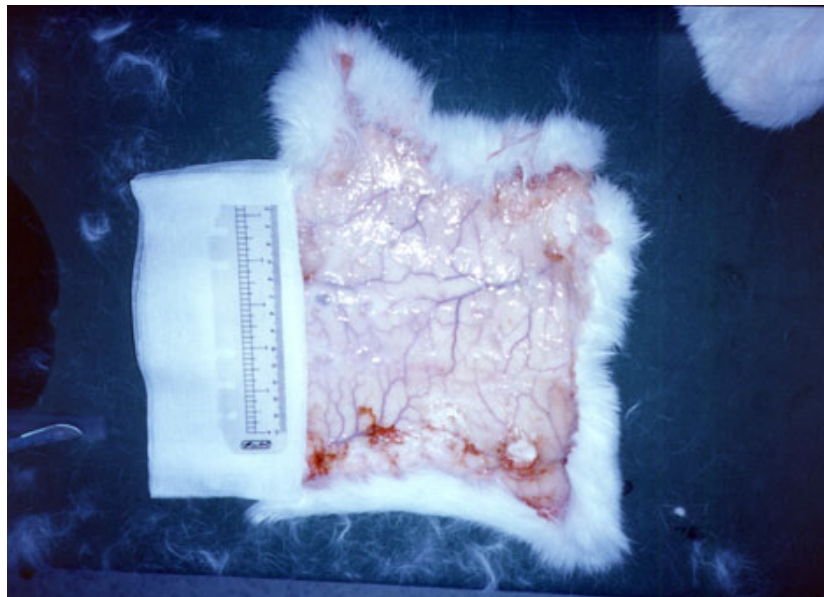


Abbildung 8: Blick auf die abgelöste Cutis eines nicht immunmodulierten Tieres von innen – Transplantat-Reste in situ sind nach 12 Wochen in vivo kaum zu erkennen

Gefunden werden konnten nach 12 Wochen die Kapsel- und Fibrin-Transplantate und das eine native Transplantat (vor der Implantation wurde ein natives Transplantat unsteril, das nicht in das Kaninchen eingebracht werden konnte). An den Stellen, an denen sich bei der Implantation Agarose-Transplantate befanden, konnte kein von der Umgebung zu unterscheidendes Gewebe herauspräpariert werden. Die Größe der Transplantate war bis auf das native Transplantat in Länge, Breite und Dicke geringer. Bei der Präparation bereitete es Schwierigkeiten, sie aus dem umliegenden bzw. eingewachsenen Gewebe zu lösen.



Abbildung 9: Blick auf die entnommenen Transplantate eines nicht immunmodulierten Tieres nach 12 Wochen in vivo. Von links nach rechts: natives Tx, Fibrin-, Kapsel- und Agarose-Transplantate.

3.1.2 Transplantate der immunmodulierten Tiere

Die makroskopischen Ergebnisse nach den Entnahmezeitpunkten 6 und 12 Wochen waren in den immunmodulierten Tieren nahezu gleich.

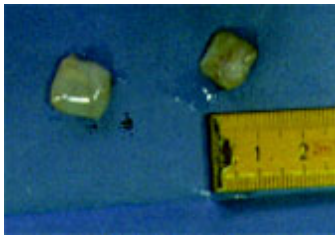


Abbildung 10: Native Transplantate nach 6 Wochen in vivo, immunmoduliert

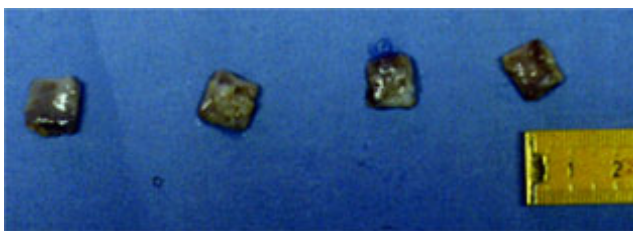


Abbildung 11: Fibrin-Transplantate nach 6 Wochen in vivo, immunmoduliert



Abbildung 12: Kapsel-Transplantate nach 6 Wochen in vivo, immunmoduliert

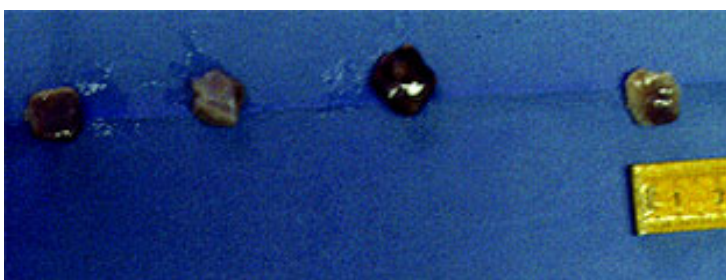


Abbildung 13: Agarose-Transplantate nach 6 Wochen in vivo, immunmoduliert

Schon nach Präparation der Cutis wurde deutlich, daß die Transplantate der immunmodulierten Tiere von fester Konsistenz waren. Sie waren gut vom umliegenden Bindegewebe abzugrenzen. Um die Transplantate fanden sich sehr geringe Gefäßinfiltrationen und diskret ausgeprägte petechiale Einblutungen.

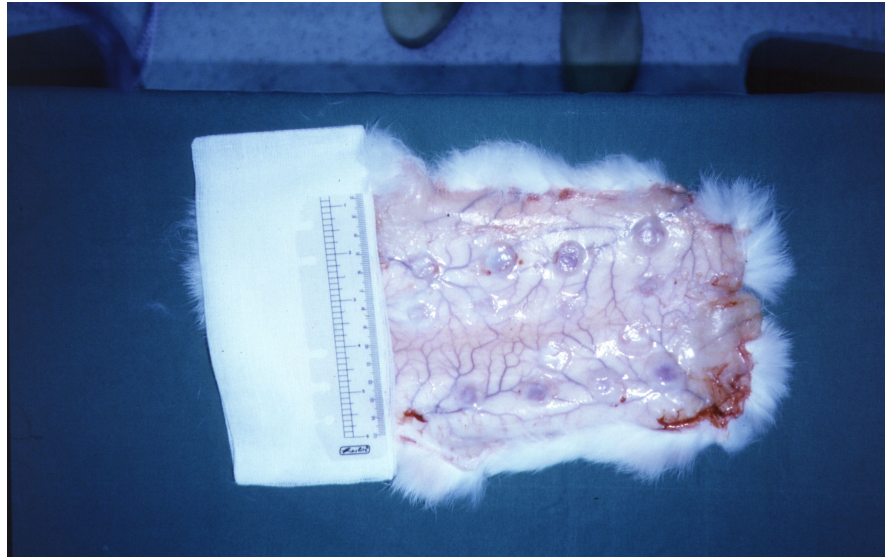


Abbildung 14: Blick auf die abgelöste Cutis eines immunmodulierten Tieres von innen – Transplantate in situ nach 12 Wochen in vivo

Dennoch konnte eine je nach Transplantat – Typ unterschiedlich ausgeprägte bindegewebige Reaktion festgestellt werden. Der bindegewebigen Reaktion entsprechend war schon die Präparation der Transplantate aus den operativ angelegten subkutanen Taschen unterschiedlich aufwendig.

Folgende Reihenfolge der bindegewebigen Rkt. ließ sich makroskopisch und präparatorisch festlegen:

Kapsel-Tx >> Fibrin-Tx >> Agarose-Tx >> native Tx.

Die Größe der Fibrin- und Agarose- Transplantate war nach 6 und nach 12 Wochen identisch: 1cm x 1cm x 0,2cm. Auch die nativen Transplantate blieben formkonstant – allerdings waren diese bei Implantation 1 cm x 1 cm x 0,1 cm groß. Die Kapseltransplantate unterlagen einer leichten Schrumpfung in Länge und Breite bei diskreter Dickenzunahme.



Abbildung 15: Blick auf die entnommenen Transplantate eines immunmodulierten Tieres von links nach rechts: native, Fibrin-, Kapsel- und Agarose-Transplantate

3.2 Histologie

Um die histologischen Bilder vergleichbar zu machen wählte ich eine Vergrößerung von ursprünglich 10-fach. An den Bildern wurden keinerlei Veränderungen vorgenommen, weder digital noch durch herkömmliche Bildbearbeitung. Um Einzelheiten zu verdeutlichen, sind andere Vergrößerungen, die entsprechend angegeben sind, verwendet worden. Eine Verdeutlichung der Immunreaktion durch entsprechende Antikörper-Färbungen konnte wegen des Fehlens eines geeigneten Anti-Kaninchen-T-Zell-Antikörper leider nicht erfolgreich dargestellt werden.

Nach 6 Wochen in vivo konnten in allen Transplantaten bis auf die nativen noch Reste der Vlies – Fasern beobachtet werden. In den Transplantaten nicht immunmodulierter Kaninchen konnte eine Abstoßungsreaktion verzeichnet werden wohingegen die immunmodulierte Gruppe keinerlei Zeichen einer zellulären Infiltration zeigte. Die Ausbildung trabekulären Knochens war in dieser Gruppe ausgeprägt. In den nativen Transplantaten konnte keine Knochenbildung und keine Immunreaktion nachgewiesen werden.

Nach 12 Wochen konnten lediglich in den immunmodulierten verkapselten Transplantaten Reste der Vlies – Fasern gesehen werden. In den nicht – immunmodulierten Kaninchen konnte der Implantationsort der einzelnen Transplantate makroskopisch nur anhand der petechialen Einblutungen im Unterhautgewebe und der Implantationsskizze lokalisiert werden. Lediglich fibröses Bindegewebe wurde hier beobachtet. Die Transplantate der immunmodulierten Tiere hingegen waren in ihrer makroskopischen Form in der Größe konstant geblieben und gegenüber dem sie umgebenden Gewebe klar abgrenzbar. Trabekuläres Knochengewebe mit hämatopoetisch aktivem Knochenmark waren in den Fibrin-, den Kapsel- und den Agarosetransplantaten nachzuweisen.

3.2.1 Vliese, nicht immunmoduliert nach 6 Wochen in vivo

Zur Beurteilung kamen 14 Transplantate eines nicht immunmodulierten Tieres nach 6 Wochen in vivo: 2 native, 4 Fibrin-, 4 Kapsel- und 4 Agarose-Transplantate.

3.2.1.1 *Nativer Knorpel ohne Immunmodulation*

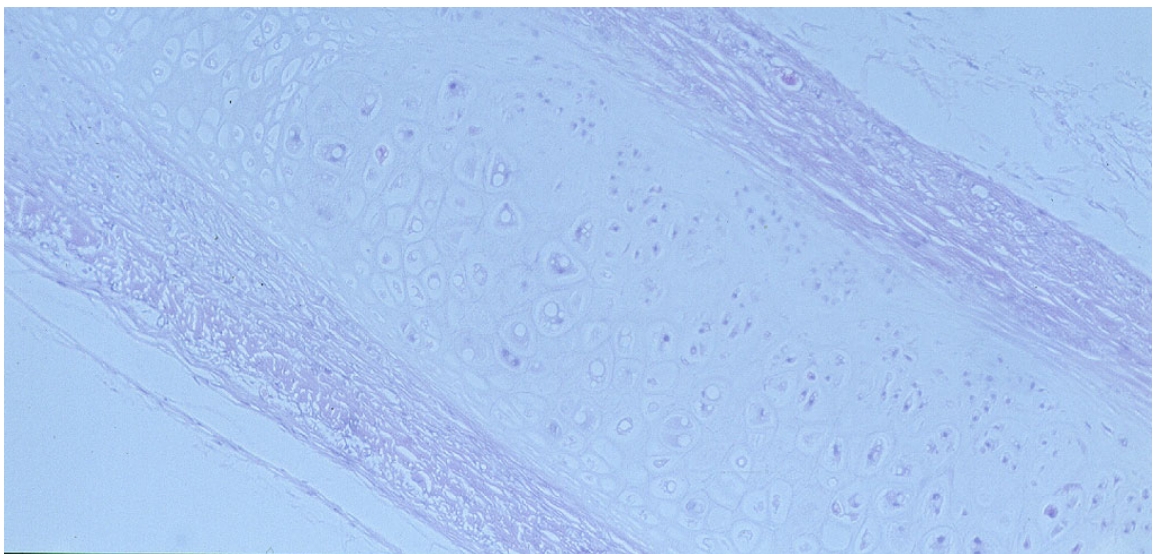


Abbildung 16: Nativer Knorpel nach 6 Wochen in vivo ohne Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

In Abbildung 16 erkennt man eine vitale Knorpelspange. Am linken Bildrand erkennt man degenerativ veränderte Chondrozyten. Der Knorpel ist von Bindegewebe umgeben. Innerhalb der Knorpelspange ist keine Immunreaktion zu verzeichnen.

3.2.1.2 Fibrin-Tx ohne Immunmodulation

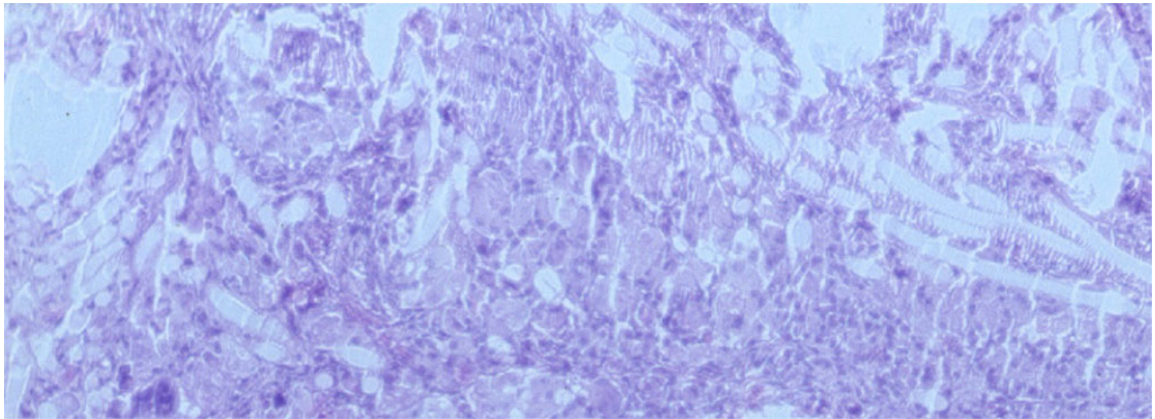


Abbildung 17: Fibrin-Tx nach 6 Wochen in vivo ohne Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

Man erkennt in Abbildung 17 vitales Gewebe. Zu erkennen sind Reste von Vliesfasern am rechten Bildrand in der Mitte. Desweiteren findet man eine granulozytäre Infiltration.

3.2.1.3 Agarose-Tx ohne Immunmodulation

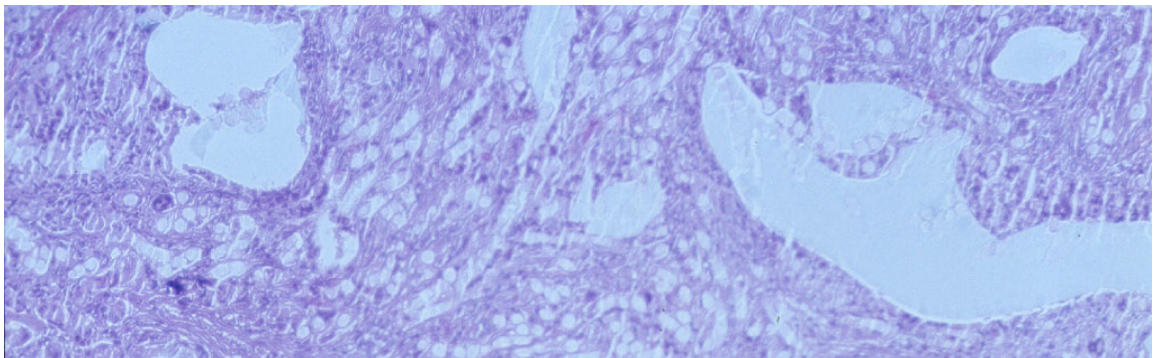


Abbildung 18: Agarose-Tx nach 6 Wochen in vivo ohne Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

In Abbildung 18 sieht man vitales Gewebe. Reste der Agarose (rechter Bildrand) und vakuolige Chondrozyten sind sichtbar.

3.2.1.4 Kapsel-Tx ohne Immunmodulation

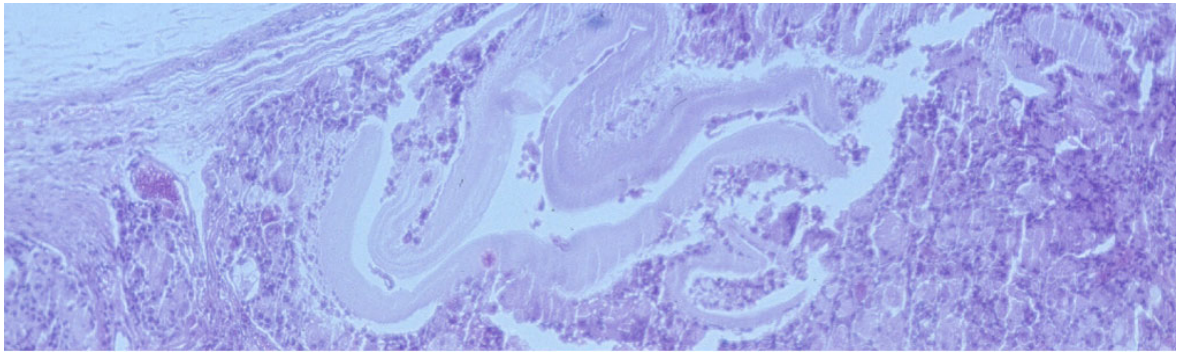


Abbildung 19: Kapsel-Tx nach 6 Wochen in vivo ohne Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

In dem histologischen Schnitt (Abbildung 19) erkennt man mittig die geschrumpfte, wellenförmig verlaufende, zerstörte Kapsel. Es sind noch einige Vliesfasern sichtbar und eine riesenzellige Reaktion. Die Zellen scheinen degenerativ verändert blaßrosa. Hervorzuheben ist die granulozytäre Infiltration entlang der Kapsel.

3.2.1.5 Zusammenfassung nicht immunmodulierte Vliese nach 6 Wochen in vivo

Zusammenfassend beurteile ich die Transplantate anhand folgender Kriterien:

- I. Vitalität: die Zellen im Transplantat werden beurteilt: „ja“ entspricht vital; „nein“ entspricht nekrotisch
- II. Degeneration: „ja“ bedeutet, im Transplantat sind gleichviele oder mehr degenerativ veränderte Zellen zu beobachten. „nein“ heißt, keine oder nur wenige Zellen sind degenerativ verändert.
- III. Immunreaktion: die Transplantate unterliegen entweder keiner Reaktion, einer granulozytären Reaktion oder einer fibrosierenden Immunreaktion.

Tabelle 3: Nicht immunmodulierte Vliese nach 6 Wochen in vivo

	native Tx	Fibrin-Tx	Kapsel-Tx	Agarose-Tx
Vitales Gewebe	2	4	4	4
Degeneration	ja	ja	ja	ja
Keine Immunreaktion	2	0	0	0
Granulozytäre Infiltration	0	4	4	4
Fibrosierung	0	0	0	0

3.2.2 Vliese, immunmoduliert nach 6 Wochen in vivo

Zur Beurteilung kamen 14 Transplantate eines immunmodulierten Tieres nach 6 Wochen in vivo: 2 native, 4 Fibrin-, 4 Kapsel- und 4 Agarose-Transplantate.

3.2.2.1 Nativer Knorpel mit Immunmodulation

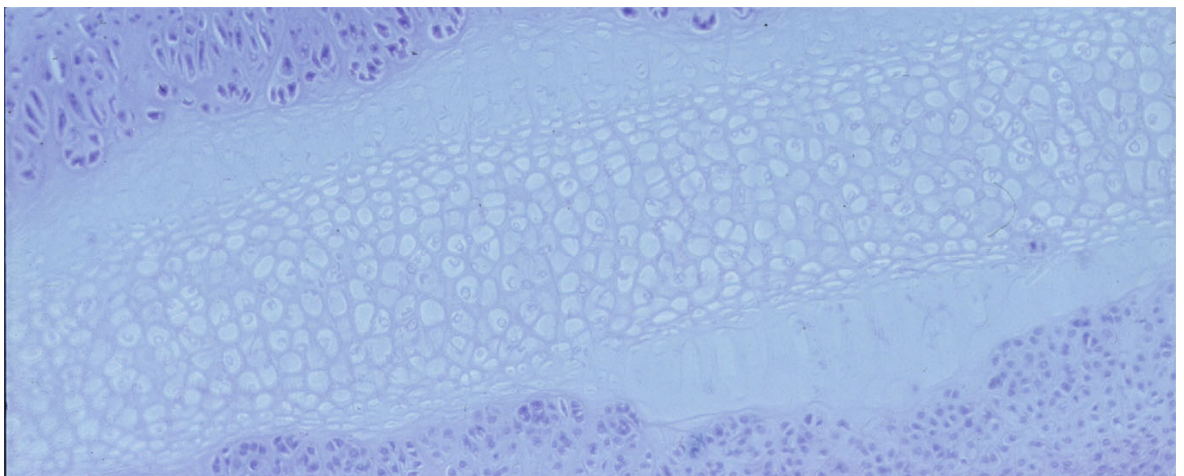


Abbildung 20: Natives Tx nach 6 Wochen in vivo mit Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

In Abbildung 20 erkennt man eine vitale dreigeteilte, blaß-violette Knorpelspange mit degenerierten Chondrozyten ohne Anzeichen einer Immunreaktion.

3.2.2.2 Fibrin-Tx mit Immunmodulation

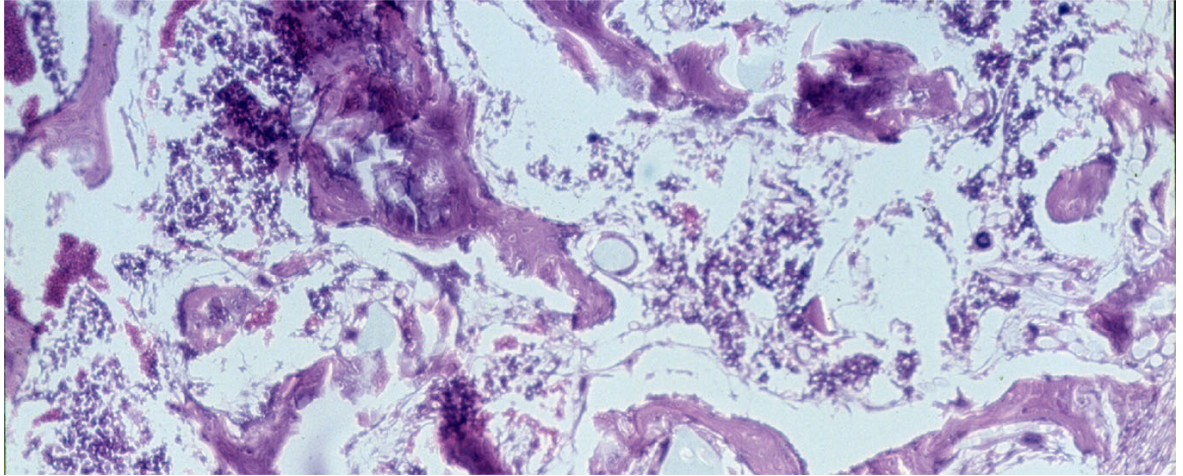


Abbildung 21: Fibrin-Tx nach 6 Wochen in vivo mit Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

In der vorliegenden Abbildung 21 erkennt man den Übergang von Knorpel zu Knochen (Mitte oben mit Kalzifizierung rechts davon), die Ausbildung trabekulären Knochens, osteoblastische Randsäume und retikuläres Bindegewebe mit blutbildenden Zellen.

3.2.2.3 Kapsel-Tx mit Immunmodulation

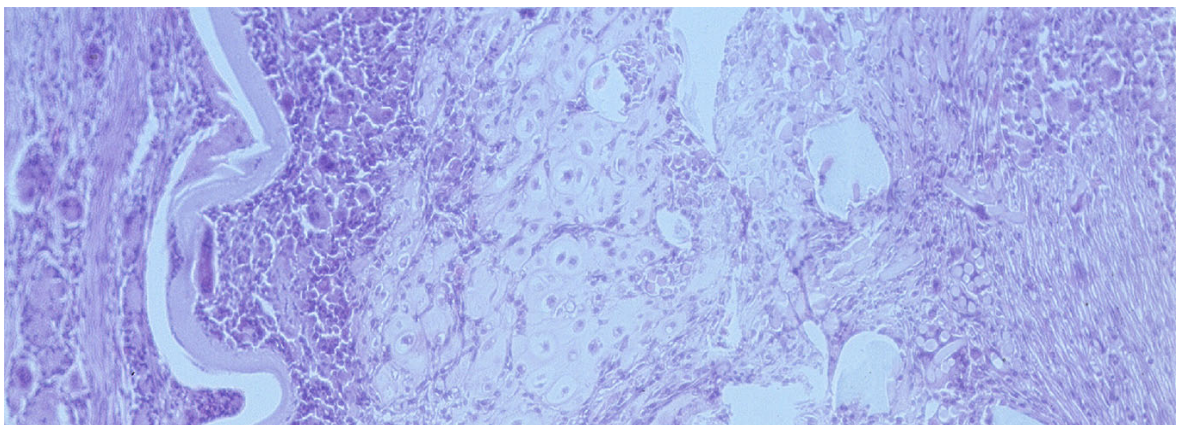


Abbildung 22: Kapsel-Tx nach 6 Wochen in vivo mit Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

In Abbildung 22 erkennt man am linken Bildrand die geschrumpfte Kapsel. Bemerkenswert ist die massive granulozytäre Infiltration im Bereich der Kapsel. Die Chondrozyten im Inneren erscheinen degeneriert: balloniert, vakuolig und blaßrosa.

3.2.2.4 Agarose-Tx mit Immunmodulation

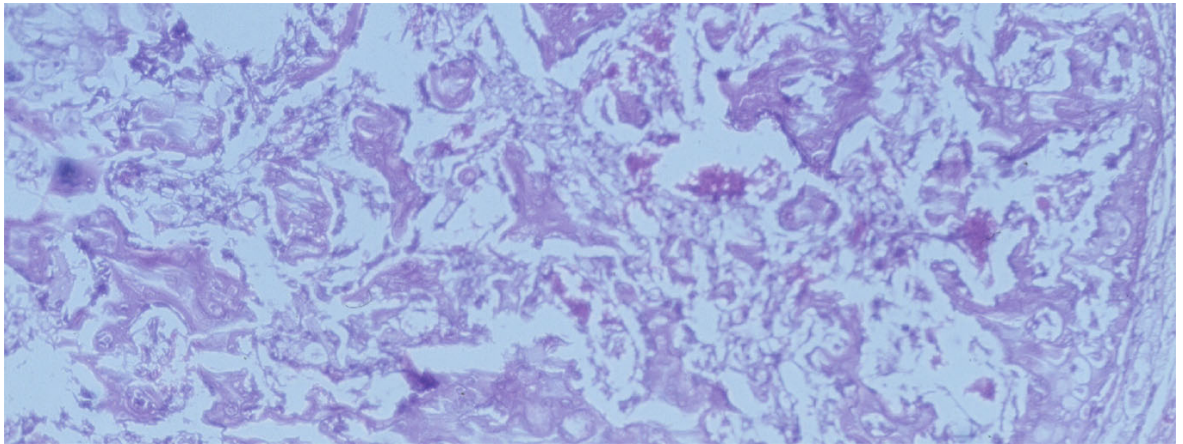


Abbildung 23: Agarose-Tx nach 6 Wochen in vivo mit Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

In den immunmodulierten Agarose-Transplantaten (Abbildung 23) erkennt man nach 6 Wochen in vivo die Metaplasie des Knorpelgewebes: zu erkennen sind sich bildende Knochentrabekel und Kalzifizierungen. Im retikulären Bindegewebe zwischen den rosa-violetten Trabekeln liegen blutbildende Zellen. Mittig im Bild kann man die Aktivität des Prozesses erahnen.

3.2.2.5 Zusammenfassung immunmodulierte Vliese nach 6 Wochen in vivo

Tabelle 4: Immunmodulierte Vliese nach 6 Wochen in vivo

	native Tx	Fibrin-Tx	Kapsel-Tx	Agarose-Tx
Vitales Gewebe	2	4	4	4
Degeneration	ja	nein	ja	nein
Keine Immunreaktion	2	4	4	4
Granulozytäre Infiltration	0	0	0	0
Fibrosierung	0	0	0	0

3.2.3 Vliese, nicht immunmoduliert nach 12 Wochen in vivo

Zur Beurteilung kamen 13 Transplantate eines nicht immunmodulierten Tieres nach 12 Wochen in vivo: 1 natives (1 vor Implantation kontaminiert) , 4 Fibrin-, 4 Kapsel- und 4 Agarose-Transplantate

3.2.3.1 *Nativer Knorpel ohne Immunmodulation*

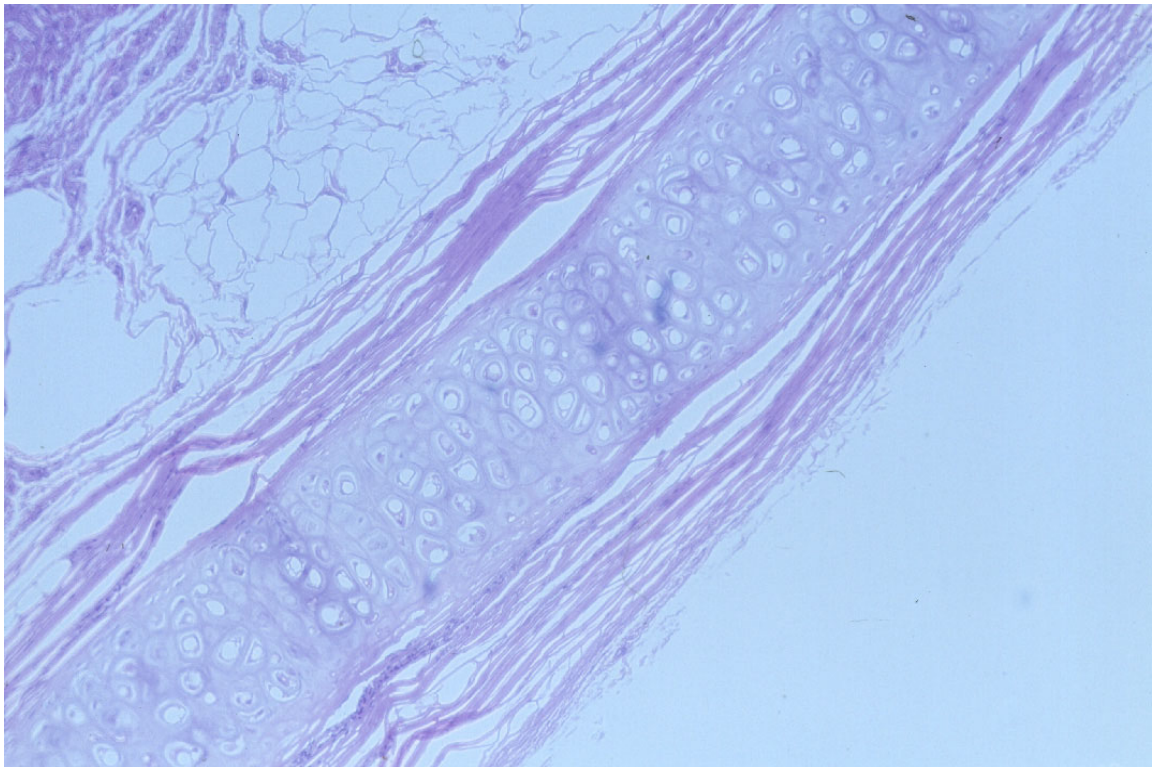


Abbildung 24: Natives Tx nach 12 Wochen in vivo ohne Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

Nachweisbar ist in Abbildung 24 die vitale native Knorpelspange. Die Chondrozyten sind vakuolig verändert. Am rechten oberen Bildrand sieht man eine umschriebene Proliferation. Infiltrationen sind nicht nachweisbar.

3.2.3.2 Fibrin-Tx ohne Immunmodulation

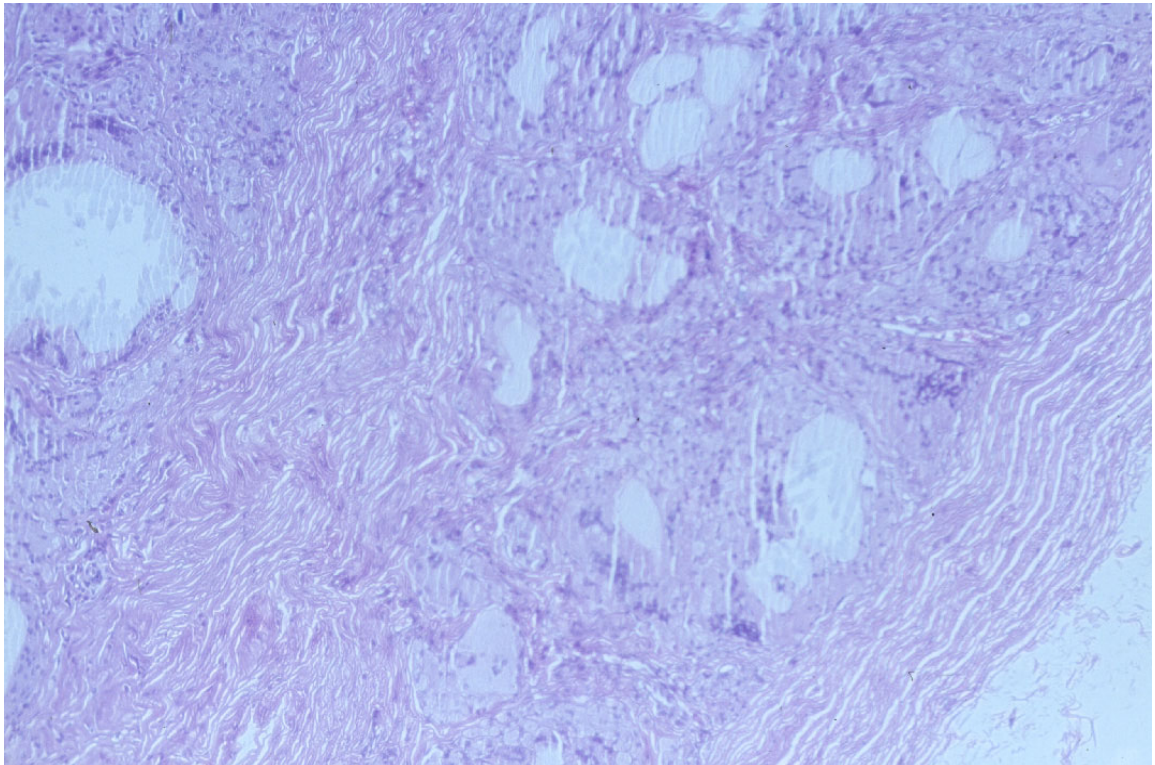


Abbildung 25: Fibrin- Tx nach 12 Wochen in vivo ohne Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

In den Fibrin-Transplantaten nach 12 Wochen in vivo ohne Immunmodulation (Abbildung 25) konnte kein Knorpel und kein Knochen erkannt werden. Die Vliesreste, hellblaue Strukturen, die der Klebesubstanz PDS entsprechen, waren von Fremdkörperriesenzellen und von Granulozyten umschlossen. Das Transplantat war bindegewebig im Sinne einer Fibrosierung verändert.

3.2.3.3 Kapsel-Tx ohne Immunmodulation

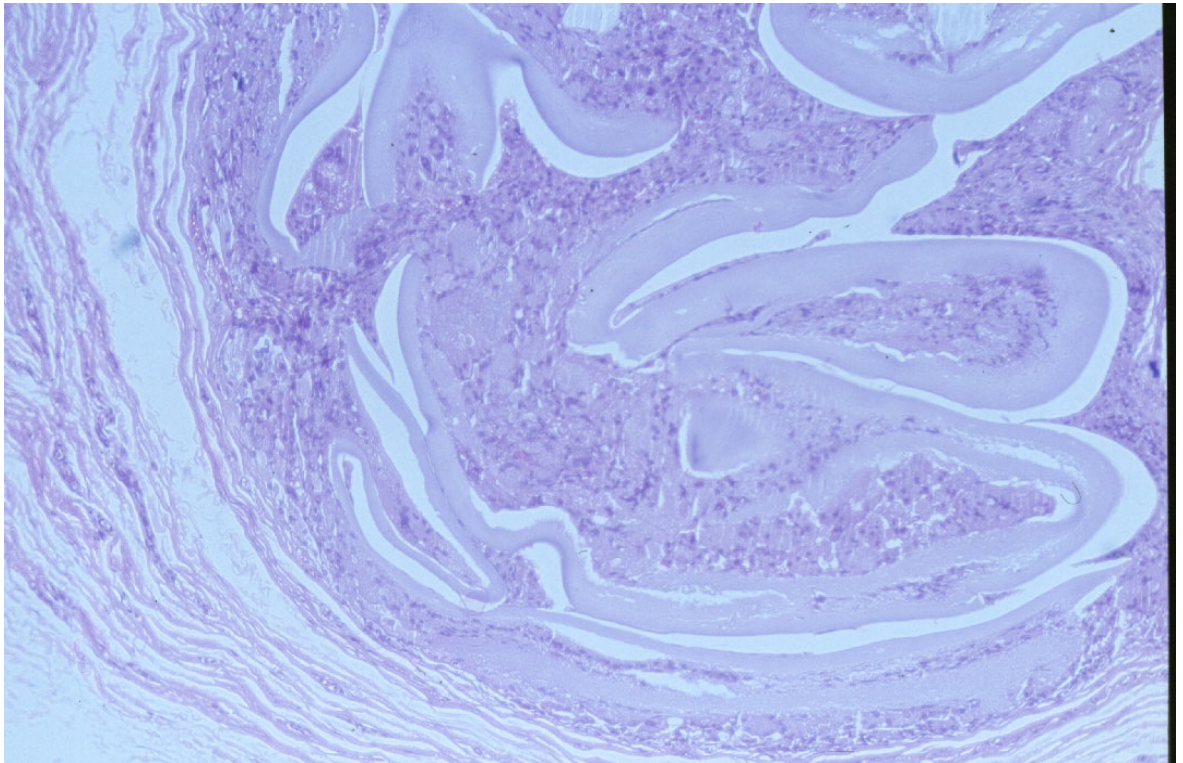


Abbildung 26: Kapsel- Tx nach 12 Wochen in vivo ohne Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

Es konnte in den Kapsel-Transplantaten (Abbildung 26) kein Knorpel und kein Knochen erkannt werden. Im Bild gut zu erkennen ist die geschrumpfte zerstörte Kapsel, die von Granulozyten gesäumt ist.

3.2.3.4 Agarose-Tx ohne Immunmodulation

An den Implantationsstellen der Kapsel-Transplantate konnte kein von der Umgebung zu unterscheidendes Material präpariert werden. Auch in der Histologie war lediglich fibrosiertes Bindegewebe zu erkennen.

3.2.3.5 Zusammenfassung nicht immunmodulierte Vliese nach 12 Wochen in vivo

Tabelle 5: Nicht immunmodulierte Vliese nach 12 Wochen in vivo.

	native Tx	Fibrin-Tx	Kapsel-Tx	Agarose-Tx
Vitales Gewebe	1	4	4	0
Degeneration	ja	*	*	*
Keine Immunreaktion	1	0	0	0
Granulozytäre Infiltration	0	0	0	0
Fibrosierung	0	4	4	4

*: Die Degeneration konnte wegen des Fehlens entsprechender Knorpel- bzw. Knochenzellen nicht beurteilt werden.

3.2.4 Vliese, immunmoduliert nach 12 Wochen in vivo

Zur Beurteilung gelangten 28 Transplantate zweier immunmodulierter Tiere nach 12 Wochen in vivo: jeweils 2 native, 4 Fibrin-, 4 Kapsel- und 4 Agarose-Transplantate.

3.2.4.1 *Nativer Knorpel mit Immunmodulation*

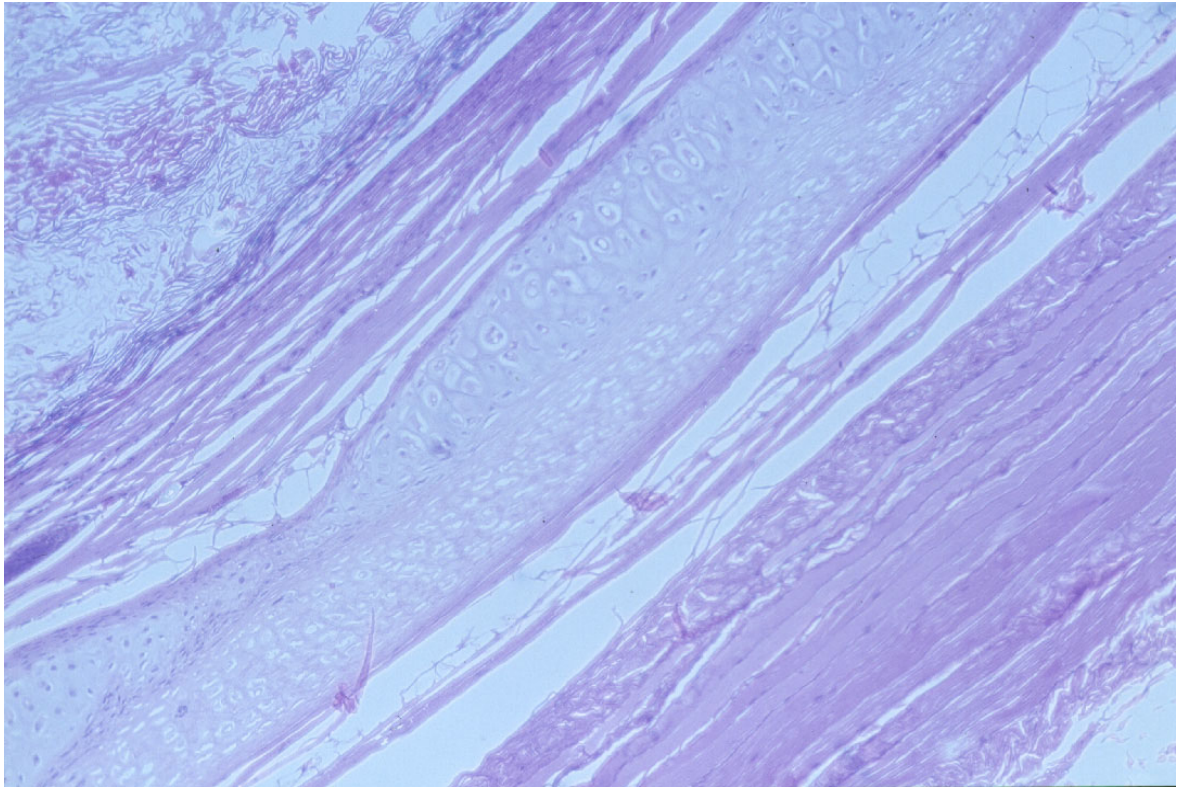


Abbildung 27: Natives Tx nach 12 Wochen in vivo mit Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

In Abbildung 27 ist eine 3-geschichtete vitale Knorpelspange mit umschriebenen Proliferationen in den Randschichten zu erkennen. Eine Immunreaktion auf den Knorpel ist nicht nachzuweisen.

3.2.4.2 Fibrin-Tx mit Immunmodulation

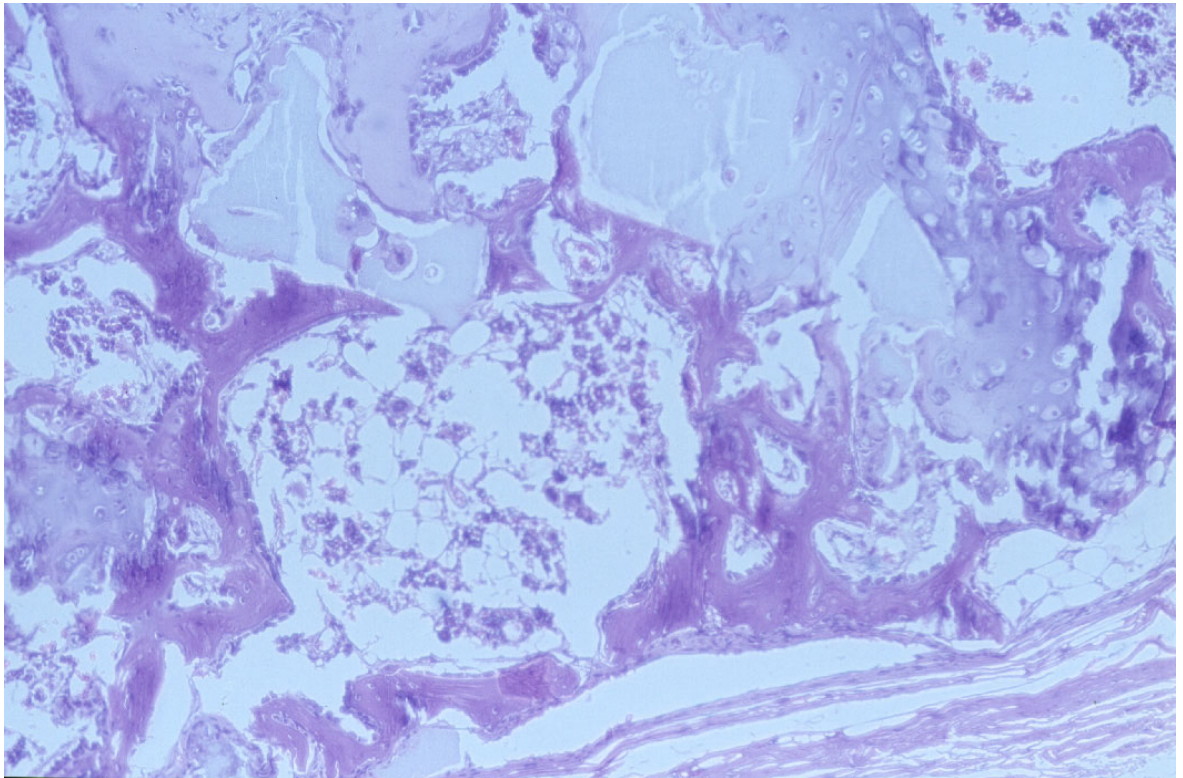


Abbildung 28: Fibrin- Tx nach 12 Wochen in vivo mit Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

In den immunmodulierten Fibrin-Transplantaten (Abbildung 28) sind größere osteoblastische Inseln (hellblau-violett) zu sehen, von denen ausgehend die Knochentrabekelbildung (dunkelviolet) beginnt. In den Zwischenräumen hat sich zellreiches retikuläres Bindegewebe im Sinne von Knochenmark ausgebildet. Das Gewebe ist vital – in lediglich kalzifiziertem Gewebe findet sich kein aktives Knochenmark.

3.2.4.3 Kapsel-Tx mit Immunmodulation

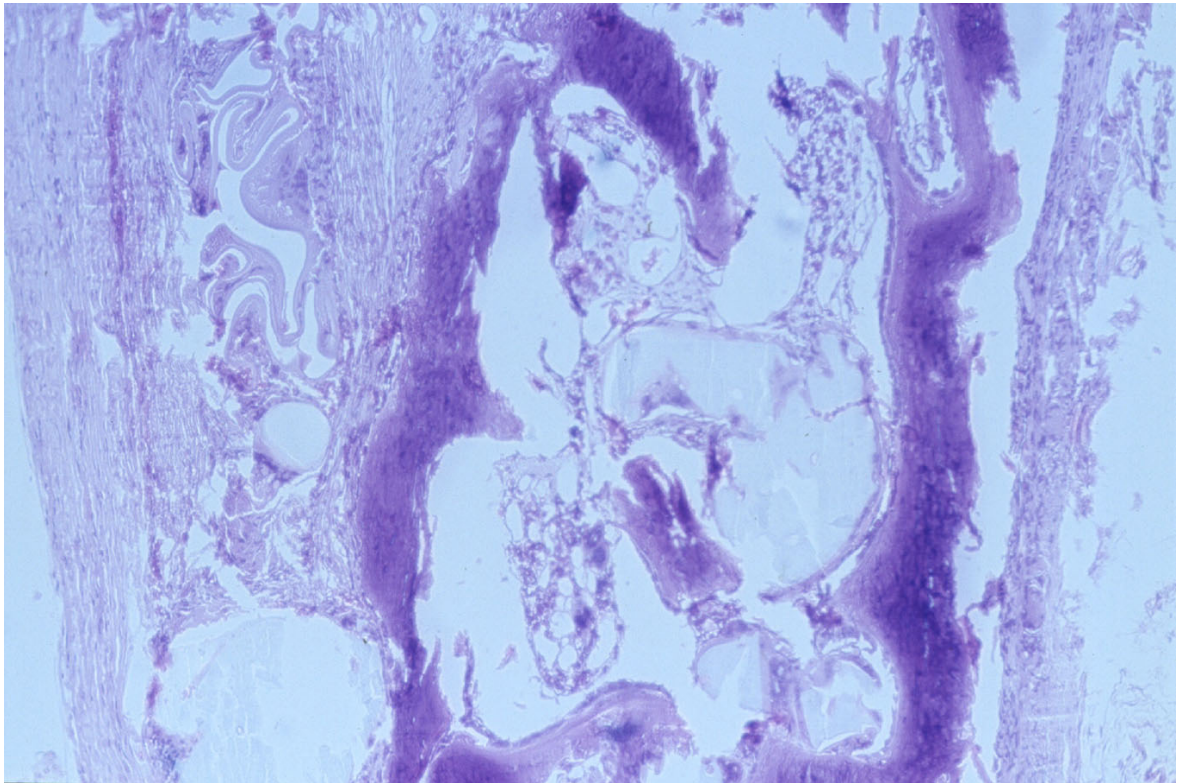


Abbildung 29: Kapsel-Tx nach 12 Wochen in vivo mit Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

In den immunmodulierten Kapsel-Transplantaten ist die Schrumpfung der Kapsel (Abbildung 29, linker Bildrand) deutlich zu erkennen. Zwischen verkalkendem Gewebe (dunkelviolet) und Kapsel hat sich fibröses Bindegewebe ausgebildet. Verglichen mit den Fibrin- und Agarose-Transplantaten hat sich weniger retikuläres Bindegewebe zwischen den kommunizierenden Knochentrabekeln ausgebildet. Der Knochen ist vital.

3.2.4.4 Agarose-Tx mit Immunmodulation

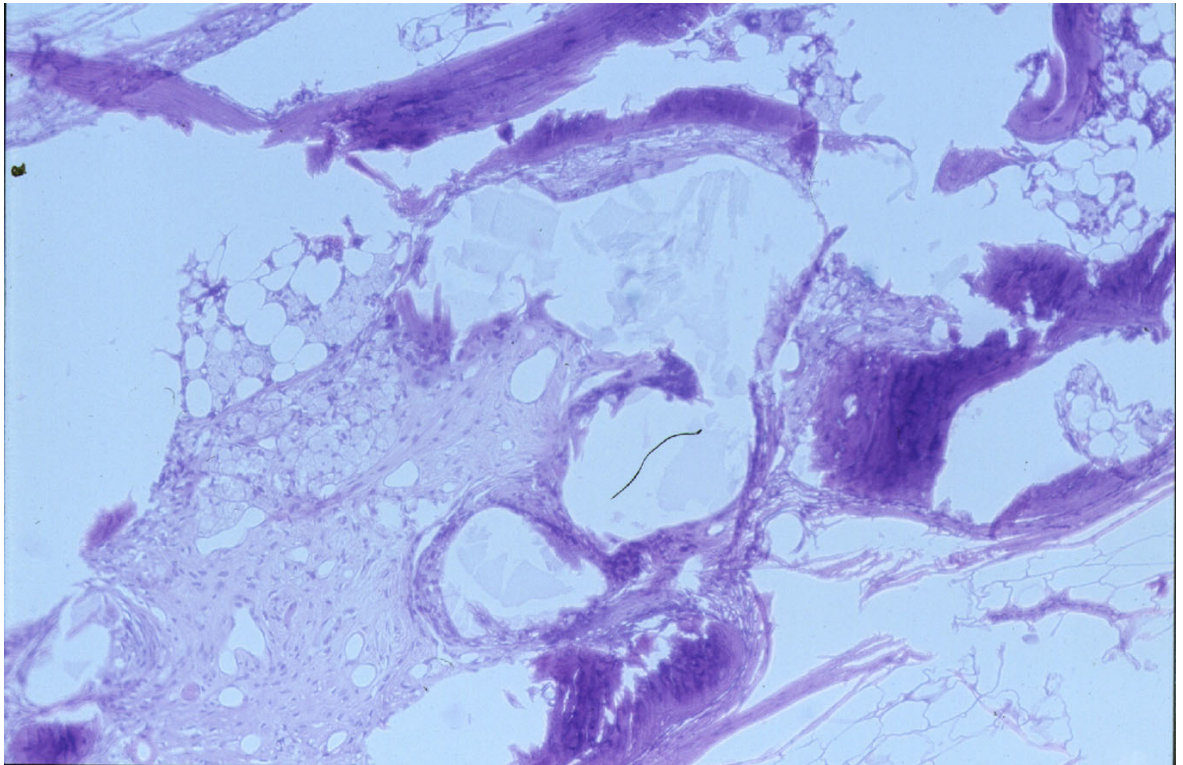


Abbildung 30: Agarose-Tx nach 12 Wochen in vivo mit Immunmodulation, ursprünglich 10-fach vergrößert

In den immunmodulierten Agarose-Transplantaten (Abbildung 30) ist ein zusammenhängendes Knochentrabekel-Gerüst zu erkennen. Von den osteoblastischen Inseln ausgehendes Osteoid (dunkelvioletter Saum der hellvioletten Inseln) und Knochenmark (linker oberer Quadrant) sind nachweisbar.

3.2.4.5 Zusammenfassung immunmodulierte Vliese nach 12 Wochen in vivo

Tabelle 6: Immunmodulierte Vliese nach 12 Wochen in vivo

	native Tx	Fibrin-Tx	Kapsel-Tx	Agarose-Tx
Vitales Gewebe	4	8	8	8
Degeneration	ja	nein	nein	nein
Keine Immunreaktion	4	8	8 *	8
Granulozytäre Infiltration	0	0	0	0
Fibrosierung	0	0	0	0

*: Im Transplantat ist keine Fibrosierung zu verzeichnen. Allerdings gibt es im Bereich der Kapsel fibrosierendes Bindegewebe.

3.2.5 Vliese nach 12 Wochen in vitro-Kultur

Beurteilt wurden 12 Vliese und 2 native Transplantate, die in vitro über 12 Wochen ernährt wurden. Sie waren nach dieser Zeit makroskopisch nicht von fester Konsistenz. Auch die ursprüngliche Form wurde nicht beibehalten. Ausnahme waren auch hier die nativen Knorpelstücke, sie behielten Größe und Form bei.

3.2.5.1 *Nativer Knorpel in vitro*

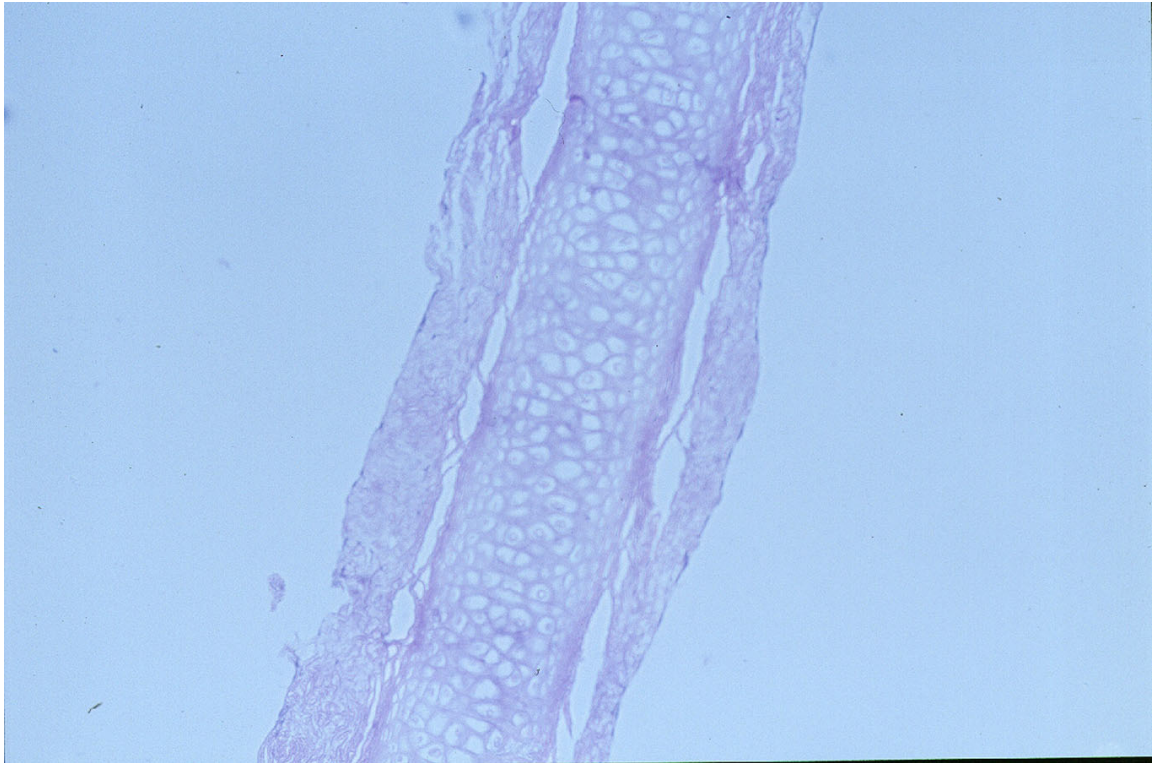


Abbildung 31: Nativer Knorpel nach 12 Wochen in vitro, ursprünglich 10-fach vergrößert

Makroskopisch gab es keine Unterschiede zu dem Zeitpunkt des Beginns der in vitro Kultivierung: Form, Konsistenz und Größe blieben konstant. Histologisch fand sich eine dystrophe, noch vitale Knorpelspange (Vgl. Abbildung 31).

3.2.5.2 Fibrin-Transplantat *in vitro*

Makroskopisch konnte ein nur noch schwach zusammenhängendes Gewebe der histologischen Beurteilung zugeführt werden. Form, Konsistenz und Größe entsprachen nicht dem Ausgangszustand.

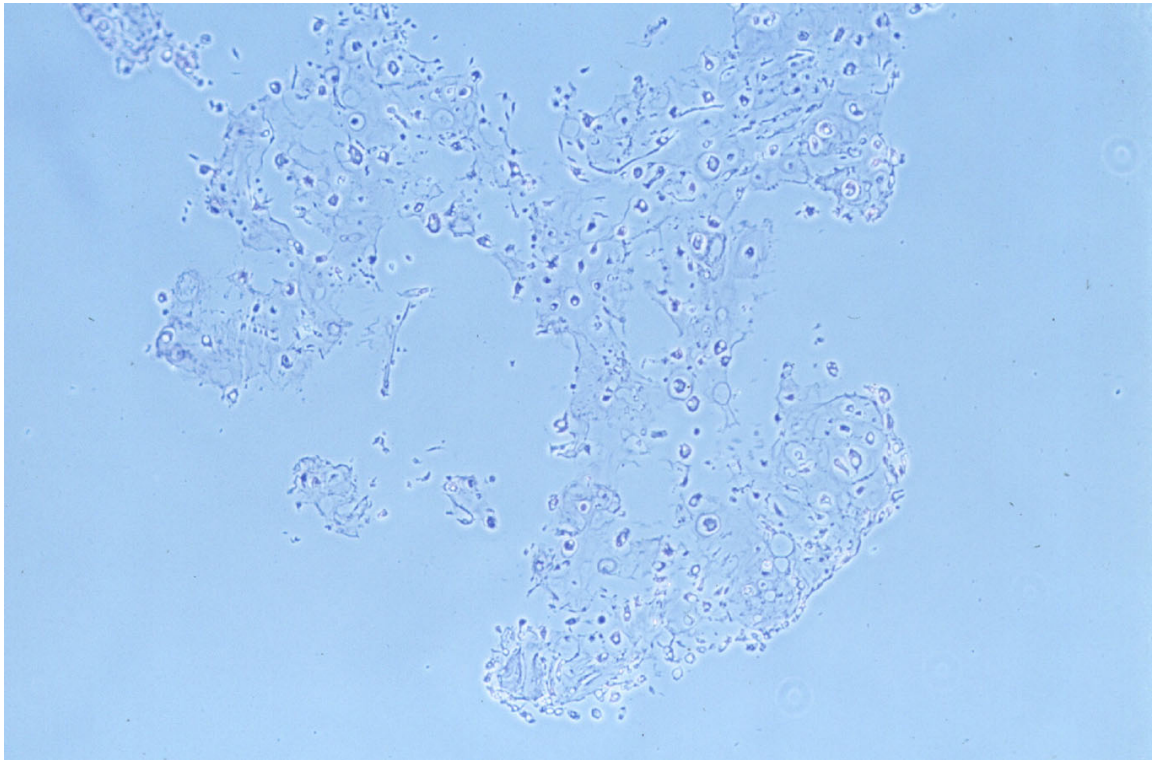


Abbildung 32: Fibrin-Tx nach 12 Wochen *in vitro*, ursprünglich 10-fach vergrößerte Aufnahme mit Kontrast

Die Histologie der zarten Schnitte (Abbildung 32) zeigte innerhalb einer chondroiden Matrix isoliert gelegene Chondrocyten. Die Zellen erschienen vital, ein stabiles Gewebe hatte sich jedoch nicht ausgebildet.

3.2.5.3 Kapsel-Transplantat *in vitro*

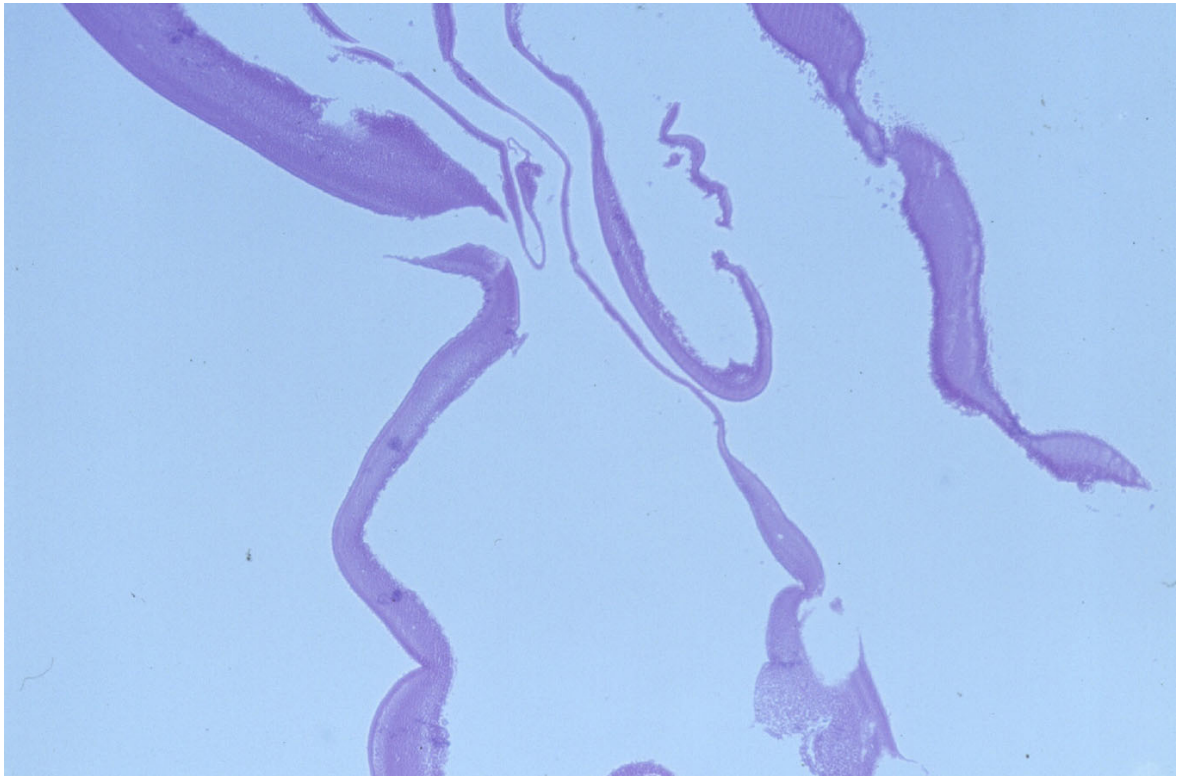


Abbildung 33: Kapsel-Tx nach 12 Wochen *in vitro*, ursprünglich 10-fach vergrößert
Lediglich die Kapsel ist von den Transplantaten übriggeblieben (Abbildung 33). Die Zellen sind durch die vielen Mediumwechsel ausgewaschen.

3.2.5.4 Agarose *in vitro*

Auch bei diesen Transplantaten konnte makroskopisch wenig Material der Histologie zugeführt werden.

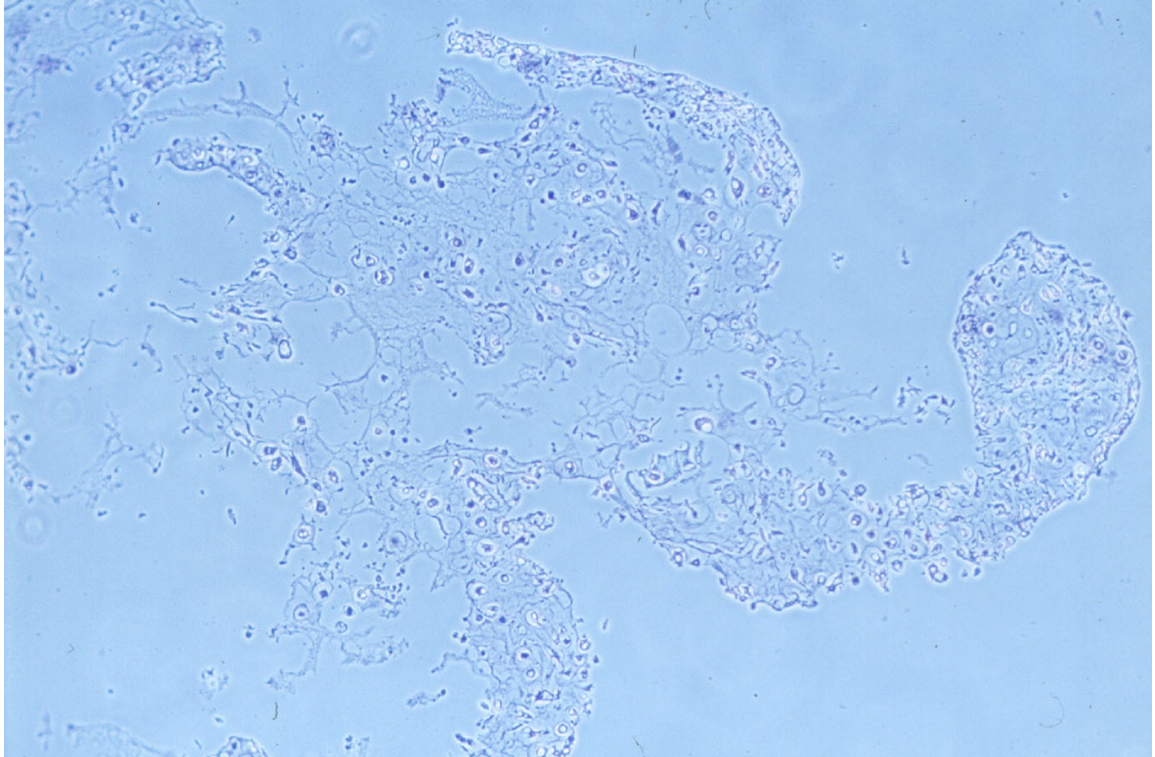


Abbildung 34: Agarose-Tx nach 12 Wochen *in vitro*, ursprünglich 10-fach vergrößerte Aufnahme mit Kontrast

Vereinzelt liegen Chondrone in einer chondroiden Matrix, die kein stabiles Gewebe ausgebildet hat. Die Chondrozyten erscheinen degeneriert (Vgl. Abbildung 34).

3.2.5.5 Zusammenfassung Vliese nach 12 Wochen in vitro

Tabelle 7: Vliese nach 12 Wochen in vitro

	native Tx	Fibrin-Tx	Kapsel-Tx	Agarose-Tx
Vitales Gewebe	2	4	0	4
Degeneration	ja	ja	*	ja
Keine Immunreaktion	x	x	x	x
Granulozytäre Infiltration	x	x	x	x
Fibrosierung	x	x	x	x

*: Keine Zellen zur Beurteilung vorhanden. x: Beurteilung bzgl. Immunreaktion nicht sinnvoll, da in vitro.

3.3 Vergleich der verschiedenen Trägersubstanzen

Der native implantierte Knorpel unterlag keiner Abstoßungsreaktion. Hinweise auf eine lokale Hyperplasie konnten in 4 von 5 nativen Transplantaten gefunden werden. Zwischen den Agarose- und den Fibrin – Transplantaten konnte kein Unterschied hinsichtlich der Transplantatabstoßung festgestellt werden. Die Kapsel der Kapsel-Tx war in allen Transplantaten granulozytär infiltriert oder zerstört, das Gewebe im Innern weniger ausgebildet als in den unverkapselten Transplantaten und Reste der Trägersubstanz, des Scaffolds, waren nach 12 Wochen noch zu beobachten.

3.4 Vergleich der Entnahmezeitpunkte

3.4.1 Nicht immunmodulierte Tiere

Bei den nicht immunmodulierten Transplantaten war zum Entnahmezeitpunkt nach 6 Wochen eine massive zelluläre Infiltration zu registrieren. Vereinzelt lagen Knorpelinseln

und Verkalkungen. Nach 12 Wochen waren keine Chondrozyten oder Osteozyten zu erkennen, aber massive bindegewebige Reaktion in Form von Fibrozyten.

3.4.2 Immunmodulierte Tiere

Bei den immunmodulierten Tieren konnte die Knochenbildung in ihrem Verlauf beobachtet werden. Befand sich das Gewebe nach 6 Wochen noch in Metaplasie und war eine Knochenbildung zu beobachten, sah man nach 12 Wochen trabekulären Knochen und hämatopoetisch aktives Knochenmark. Zu beiden Zeitpunkten konnte man keine bis eine minimale zelluläre Infiltration erkennen.

3.5 Vergleich mit/ohne Immunmodulation

Sowohl nach 6 als auch nach 12 Wochen ist der Vorteil der vorübergehenden Immunmodulation deutlich zu erkennen. Die nicht immunmodulierten Transplantate waren nach 6 Wochen teilweise, nach 12 Wochen ganz resorbiert und durch fibröses Bindegewebe ersetzt. Hingegen konnten makroskopisch sichtbare Transplantate auch nach 12 Wochen den zuvor immunmodulierten Tieren entnommen werden.

3.5.1 Statistische Auswertung

Wie oben geschildert wurden nominal folgende Merkmale bestimmt:

- Immunreaktion
- Granulozytäre Infiltration
- Fibrosierung

Die unabhängigen Gruppen der vorliegenden Arbeit sind: „Immunmoduliert“ und „Nicht Immunmoduliert“. Für die einzelnen Merkmale sind Kreuztabellen erstellt worden und die Ergebnisse hinsichtlich ihrer Signifikanz geprüft worden nach Chi-Quadrat (Pearson).

Für die unabhängigen Gruppen: „Immunmoduliert“ und „Nicht immunmoduliert“ nach 6 Wochen in vivo wurden die folgenden Variablen statistisch beurteilt:

„Immunreaktion“: neg. bedeutet, daß keine Immunreaktion stattgefunden hat, pos. bedeutet, daß eine Immunreaktion stattgefunden hat.

Granulozytäre Infiltration: neg. bedeutet, daß keine oder nur eine geringe granulozytäre Infiltration zu sehen war, pos. wurden die Transplantate genannt, in denen eine granulozytäre Infiltration zu verzeichnen war.

Fibrosierung: pos. bedeutet: das Transplantat ist fibrosiert, neg. bedeutet, das Transplantat unterlag keiner Fibrosierung.

3.5.1.1 Statistischer Vergleich nach 6 Wochen

Tabelle 8: Kreuztabelle des Merkmals "Immunreaktion" für den Entnahmezeitraum 6 Wochen

Gruppe: IMMUNREAKTION nach 6 Wochen in vivo			
Kreuztabelle			
	Gruppe		
Immunreaktion	immunmoduliert	nicht immunmoduliert	gesamt
neg.	14	2	16
pos.		12	12
gesamt	14	14	28
Chi-Quadrat nach Pearson:	asymptomatische Signifikanz (2-seitig) <0,0001		

Tabelle 9: Kreuztabelle des Merkmals "Granulozytäre Infiltration" für den Entnahmezeitraum 6 Wochen

Gruppe: GRANULOZYTÄRE INFILTRATION nach 6 Wochen in vivo			
Kreuztabelle			
	Gruppe		
Granulozyt. Infiltration	immunmoduliert	nicht immunmoduliert	gesamt
neg.	14	2	16
pos.		12	12
gesamt	14	14	28
Chi-Quadrat nach Pearson:	asymptomatische Signifikanz (2-seitig) <0,0001		

Wie der Tabelle 8 und der Tabelle 9 zu entnehmen ist, sind die Unterschiede der Immunreaktionen signifikant: Die immunmodulierte Gruppe unterliegt keiner Reaktion, während die nicht immunmodulierte Gruppe eine Immunreaktion im Sinne einer granulozytären Infiltration erfuhr.

3.5.1.2 Statistischer Vergleich nach 12 Wochen

Tabelle 10: Kreuztabelle des Merkmals "Immunreaktion" für den Entnahmezeitraum 12 Wochen

Gruppe: IMMUNREAKTION nach 12 Wochen in vivo			
Kreuztabelle			
	Gruppe		
Immunreaktion	immunmoduliert	nicht immunmoduliert	gesamt
neg.	28	1	29
pos.		12	12
Gesamt	28	13	41
Chi-Quadrat nach Pearson:	asymptomatische Signifikanz (2-seitig) <0,0001		

Tabelle 11: Kreuztabelle des Merkmals "Fibrosierung" für den Entnahmezeitraum 12 Wochen

Gruppe: FIBROSIERUNG nach 12 Wochen in vivo			
Kreuztabelle			
	Gruppe		
Fibrosierung	immunmoduliert	nicht immunmoduliert	gesamt
neg.	28		28
pos.		13	13
gesamt	28	13	41
Chi-Quadrat nach Pearson:	asymptomatische Signifikanz (2-seitig) <0,0001		

Wie der Tabelle 10 und der Tabelle 11 zu entnehmen ist, sind die Unterschiede der Immunreaktionen signifikant: Die immunmodulierte Gruppe unterliegt keiner Reaktion, während die nicht immunmodulierte Gruppe eine Immunreaktion im Sinne einer Fibrosierung erfuhr.

4 Diskussion

4.1 Erfahrungen im Tissue Engineering von Chondrozyten

Einige Studien über Knorpeltransplantationen, das Tissue Engineering von Knorpel und die Reparatur entsprechender Defekte wurden in den letzten Jahren durchgeführt. Viele Ansätze zur Optimierung von Zell – Vlies – Konstrukten wurden untersucht. 1994 zeigten Puelacher et al. an der Nacktmaus die Möglichkeit, daß die Variation der Zelldichte in vitro in bezug auf das gewünschte Transplantat von Bedeutung ist.¹⁵ In der vorliegenden Arbeit ist aufgrund eigener Erfahrungen eine Zelldichte von 6 Mio. Zellen / 200µl Vliesvolumen verwendet. Verschiedene biodegradierbare Scaffolds wurden und werden untersucht^{16 17} und Methoden, die Langzeit – Kultivierung zu vereinfachen, wurden von Sitterting et al. entwickelt¹⁸. Autologe Knorpel – Transplantationen wurden durchgeführt^{19 20}. Nur unzureichend vergleichbare unterschiedliche Polymere im Tissue Engineering von Knorpel wurden untersucht. So führen Polyglycolsäure (PGA) / Poly(l+)-lactat (PLA) im Verhältnis von 90:10 zu stärkerer Knorpel – Matrix – Produktion als reine PLLA Scaffolds²¹. Während PGA – Scaffolds in geschlossenen Systemen die Proteoglykansynthese erhöhen, vermögen Scaffolds, die aus Kollagen bestehen, eben die Kollagensynthese zu erhöhen²². Im Vergleich von Pluronsäure, Calciumalginate und PGA zur Herstellung elastischen Knorpels, scheint Pluronsäure das beste Scaffold zu sein²³. Hyaluronsäure - Derivate²⁴ binden mehr Chondrocyten als Calcium – Phosphat - Scaffolds²⁵. Sie scheinen biocompatibel zu sein²⁶ und die Redifferenzierung von Chondrozyten zu unterstützen²⁷. Inzwischen stehen Kombinationen bekannter Materialien im Mittelpunkt des Interesses: Chondroitinsulfat - A - Chitosan Komplexe könnten als zukünftiges Trägermaterial dienen und die Chondrogenese unterstützen²⁸. Die Matrixbildung durch Chondrocyten muß aber auch als eine Antwort auf das Trägermaterial verstanden werden und nicht nur als eine Reaktion auf die biologische Umgebung²⁹. Auch Fibrin - Alginate Matrices sind für die Bildung stabilen Knorpelgewebes geeignet^{30 31}. Von besonderem Interesse sind auch mesenchymale Stammzellen. Sie sind in der Lage zu Chondrozyten³² oder - in porösen Keramik – Scaffolds - zu Knochen zu differenzieren³³. So wird auch der Osteoblast als hochentwickelter Fibroblast beschrieben³⁴, d.h. es bedarf komplexer Modulation, damit Knochen entsteht. Die nächsten Schritte auf dem Weg zur klinischen Anwendung von Tissue Engineering waren und sind tierexperimentelle Studien: In der Nacktmaus wurde die Bildung eines “Neo – Knorpels” durch Rinder-Chondrozyten beschrieben³⁵, die Formerhaltung von TE – Knorpel in vorgeformten biodegradierbaren Scaffolds³⁶ und die Abhängigkeit der Qualität des in der Maus ausgebildeten Knorpels von

der Anzahl der implantierten Zellen wurden untersucht³⁷. Freed et al. untersuchten TE-Knorpel im Weltall. Sie entdeckten, daß die Eigenschaften mechanische Stabilität und Größe des sich bildenden Gewebes von der Gewichtskraft abhängen³⁸. Nach Untersuchungen von Riesle et al. sind TE – Knorpel nativem Knorpel hinsichtlich der gewichtstragenden Kollagene II und IX ähnlich³⁹. Sogar die dreidimensionale Anordnung verschiedener Zelltypen war schon erfolgreich: Chondrocyten und Tendozyten wurden zu Phalangen ähnlichen Gebilden in der athymischen Nacktmaus⁴⁰. Gelenkdefekte wurden in vivo mit TE – Chondrocyten behandelt⁴¹ und die Untersuchungen implantierter autologer Chondrocyten scheinen erfolgreich zu sein⁴². Aber schon von den Anfängen des TE an wurden Wege zum Schutz des Transplantates gesucht und gefordert, Transplantate einzukapseln erschien eine Möglichkeit⁴³. Fibrinmonomere wurden erfolgreich zur Verkapselung isolierter Chondrocyten benutzt⁴⁴. Auch Alginat wurde als geeignetes Material zur Einkapselung beschrieben⁴⁵. Haisch und Groeger verkapselten Knorpelimplantate mit Polyelectrolytkomplex – Membranen und konnten so das Problem der Transplantatabstoßung im Tiermodell verringern⁴⁶.

4.1.1 Physiologische Knochenentwicklung

Während der sogenannten enchondralen Ossifikation werden knorpelige Gerüste durch Knochen ersetzt. Die enchondrale Ossifikation findet sich bei Röhrenknochen. Bei der desmalen Ossifikation nimmt man an, daß der Vorknorpel selbst verknöchert. Die desmale Ossifikation findet bei Plattenknochen statt.

4.1.2 Knochenentwicklung ohne Zell – Vlies - Konstrukte

Knochen kann im Organismus entstehen, wenn geeignete Trägermaterialien implantiert werden. So werden diverse Keramik-Transplantate mit entsprechend konfigurierten Oberflächen eingesetzt, damit Knochen entstehen kann.

4.2 Knochenbildung im Tierexperiment der vorliegenden Arbeit

Zur Veranschaulichung der Knochenbildung der TE-Transplantate seien an dieser Stelle in der van Kossa-Färbung stellvertretend Fibrin-, Agarose- und Kapsel-Transplantate aus der immunmodulierten Gruppe die entsprechenden Transplantate der nicht immunmodulierten Gruppe gegenübergestellt. Verkalkungen stellen sich hier blau-schwarz dar. Zu bemerken sind die trabekulären verkalkten Strukturen (Knochen) in den Bildern auf der rechten Tabellenhälfte.

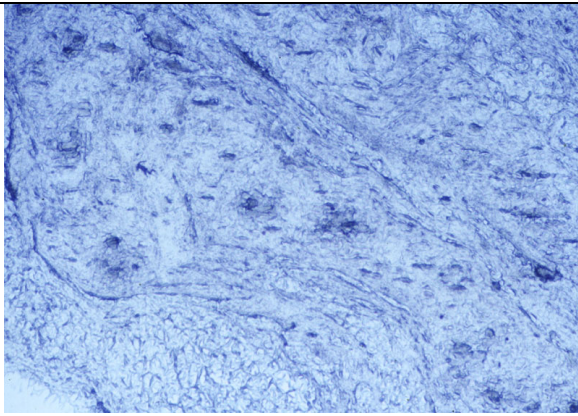


Abbildung 35: Fibrin-Tx, nicht immunmoduliert nach 12 Wochen in vivo. Van Kossa Färbung, ursprünglich 4-fach vergrößert

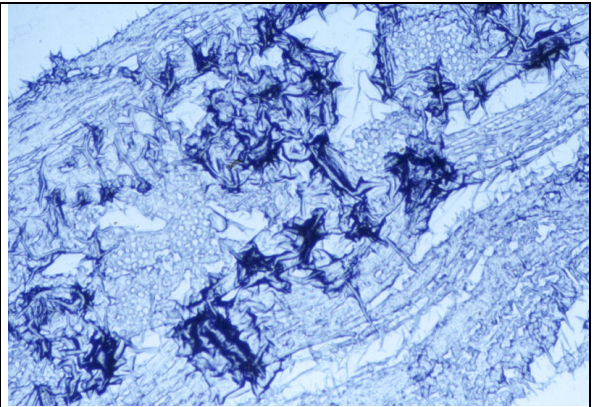


Abbildung 36: Fibrin-Tx, immunmoduliert nach 12 Wochen in vivo. Van Kossa Färbung, ursprünglich 4-fach vergrößert.

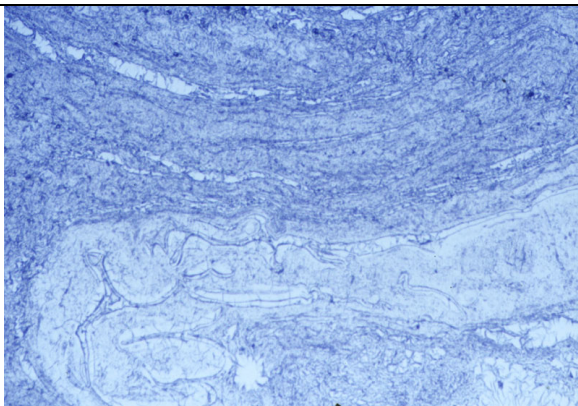


Abbildung 37: Kapsel-Tx, nicht immunmoduliert nach 12 Wochen in vivo. Van Kossa Färbung, ursprünglich 4-fach vergrößert. Die Kapsel ist hell am unteren Bildrand „aufgerollt“ sichtbar.

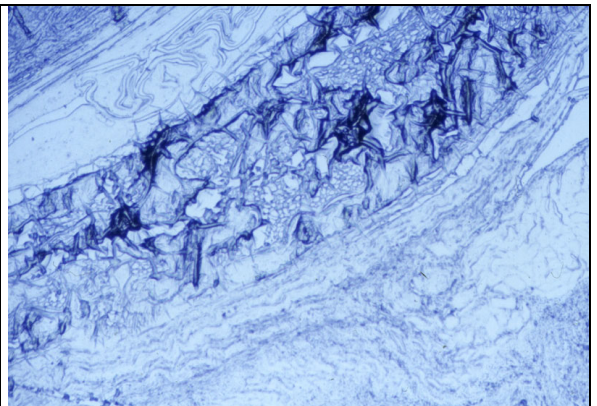


Abbildung 38: Kapsel-Tx, immunmoduliert nach 12 Wochen in vivo. Van Kossa Färbung, ursprünglich 4-fach vergrößert

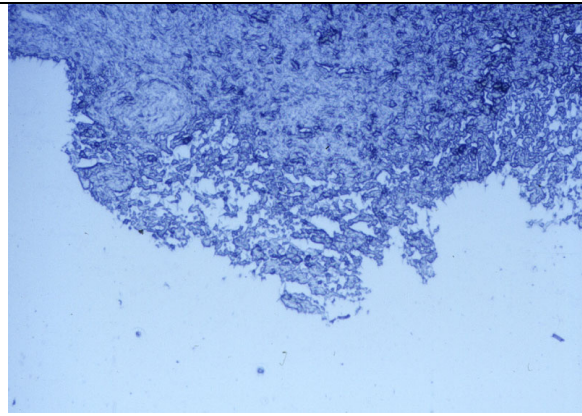


Abbildung 39: Agarose-Tx, nicht immunmoduliert nach 12 Wochen in vivo. Van Kossa Färbung, ursprünglich 4-fach vergrößert

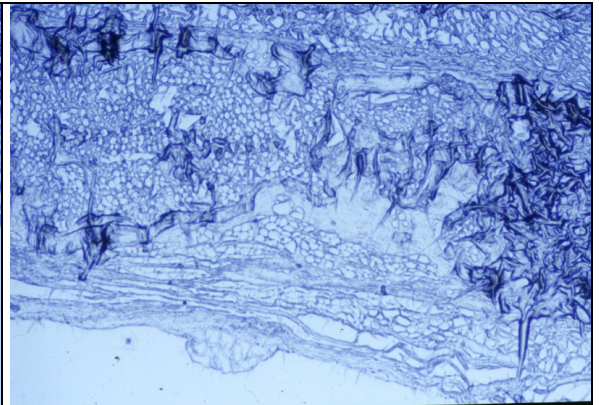


Abbildung 40: Agarose-Tx, immunmoduliert nach 12 Wochen in vivo. Van Kossa Färbung, ursprünglich 4-fach vergrößert

Als Beweis der zellulären Immunreaktion bei den nicht immunmodulierten Transplantaten und der Vitalität des Knochens der immunmodulierten Transplantate seien hier noch zusätzliche Vergrößerungen in der HE-Färbung gegenübergestellt. In der Überblicksvergrößerung (ursprünglich 4-fach) zunächst die Gegenüberstellung des Transplantates in seinem Querschnitt:

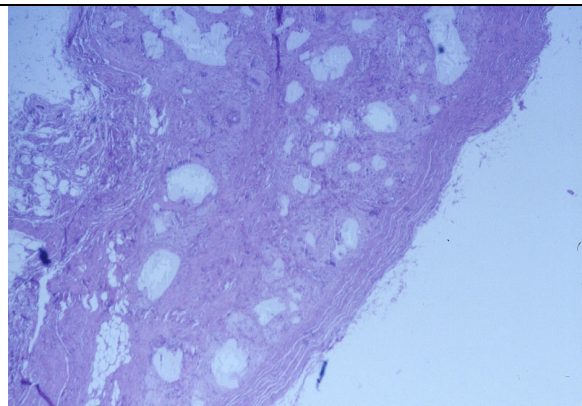


Abbildung 41: Fibrin-Tx, nicht immunmoduliert nach 12 Wochen in vivo. HE-Färbung, ursprünglich 4-fach vergrößert. Fibrosierendes Bindegewebe

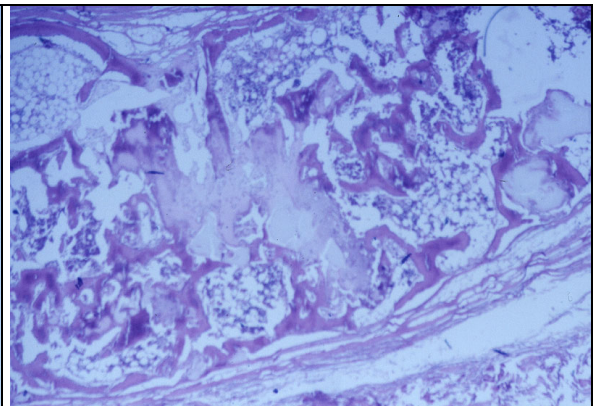
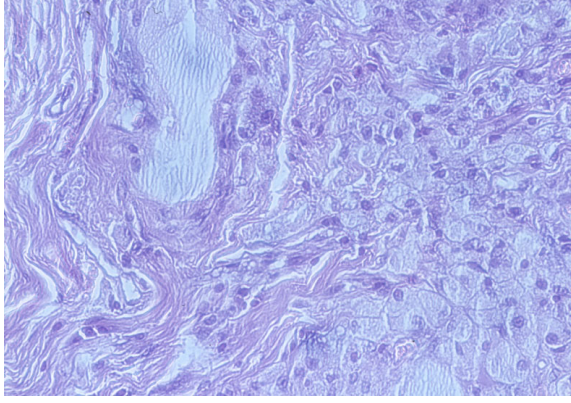
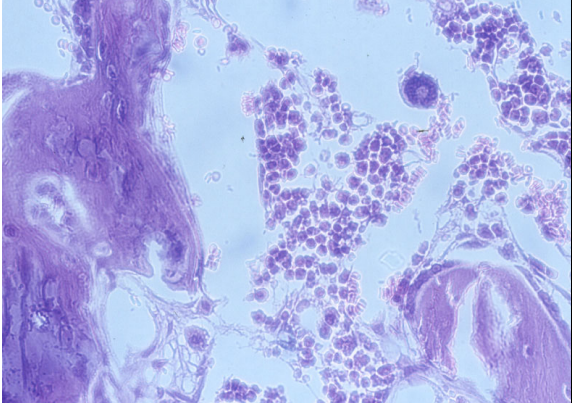


Abbildung 42: Fibrin-Tx, immunmoduliert nach 12 Wochen in vivo. HE-Färbung, ursprünglich 4-fach vergrößert. Kommunizierende Knochentrabekel

Ursprünglich 40-fach vergrößert erkennt man im nicht immunmodulierten Transplantat die Schaumzellen und das fibrinöse Bindegewebe (linke Abbildung 43). Knochen, Osteoblasten, Osteoid, zellreiches Knochenmark mit einem Megakaryozyten sieht man im immunmodulierten Transplantat (Abbildung 44).

	
<p>Abbildung 43: Fibrin-Tx, nicht immunmoduliert nach 12 Wochen in vivo. HE-Färbung, ursprünglich 40-fach vergrößert</p>	<p>Abbildung 44: Fibrin-Tx, immunmoduliert nach 12 Wochen in vivo. HE-Färbung, ursprünglich 40-fach vergrößert</p>

4.3 Kultur der Chondrozyten

4.3.1 Ohr als Explantationsort

Für mögliche klinische Anwendungen wäre das Ohr idealer Explantationsort der zu kultivierenden Chondrocyten. Ein in Lokalanästhesie schmerzfreier Zugriff und eine gute Wundheilung prädestinieren das Ohr für Tissue-Engineering-Anwendungen. Daß Chondrozyten aus Ohrknorpel geeignet erscheinen, bestätigen auch Panossian et al.: Nach deren Untersuchungen an der Nacktmaus, erscheint es sinnvoller, Zellen des (geeigneten) Ohr-Knorpels zu kultivieren als unterschiedliche Zelldichten der Chondrozyten im Vlies zu verwenden⁴⁷.

4.3.2 Temperatur

Zur Kultivierung der Zellen wurde aufgrund langfristiger Erfahrungen im Kultivieren von Chondrozyten innerhalb der Arbeitsgruppe im Brutschrank eine Temperatur von 37°C gewählt. (Kaninchen-) Ohren besitzen aber aufgrund der anatomischen Lage eine geringere Temperatur – auch während des Wachstums.

4.3.3 Differenzierung

Während der Kultivierung unterliegen die Chondrocyten einer Dedifferenzierung⁴⁸. Sie erscheinen während der Dauer der In-vitro-Kultur nicht in der für sie typischen Morphologie sondern fibroblastenähnlich. Collagen I und III⁴⁹ wird anstelle Kollagens II produziert. Aber auch die Redifferenzierung von Kaninchenchondrozyten, die zuvor eine Dedifferenzierungsphase durchlaufen hatten⁵⁰, wurde von Benya et al. beschrieben. Ob alle Fähigkeiten des Chondrocyten zu seiner Ausreifung bestehen bleiben, ist nicht geklärt. Ich habe mich deshalb bewußt auf eine lediglich dreifache Passage (Aussaat und 2 anschließende Passagen) der Monolayer – Kulturen beschränkt. Vorbehandlung der Chondrozyten mit Wachstumsfaktoren erscheinen derzeit als sinnvolle Ergänzung. In der Zellkultur mit dem Wachstumsfaktor FGF-2 vorbehandelte Chondrozyten und in 3-D Kultur mit BMP-2 behandelte Vliese bilden qualitativ höherwertigen Knorpel aus.⁵¹

Die vorliegende Beobachtung der Ausbildung von Knochengewebe könnte unter anderem auch hier begründet sein: Die Knorpelzellen verlören die Fähigkeit, sich auf der Stufe von Knorpel zu etablieren und würden entsprechend der physiologischen Knochenbildung nur eine Zwischenstufe darstellen. Vgl. Frenkel et al.⁵²

4.4 Verschieden Trägermaterialien

Die oben beschriebene Hyperplasie der nativen Transplantate sehe ich als Zeichen einer gemessen an der Dicke des Transplantates zu geringen nutritiven Versorgung bzw. einer lokalen Hypoxie an. Erstaunlicherweise konnte zwischen den Agarose- und den Fibrin-Transplantaten kein Unterschied hinsichtlich der Transplantatabstoßung festgestellt werden. Die Kapsel – Transplantate aber erschienen weniger günstig als angenommen: Die Kapsel war zumeist aufgelöst, das Gewebe im Innern weniger ausgebildet und Reste der Trägersubstanz, des Scaffolds, waren nach 12 Wochen noch zu beobachten.

4.5 Immunogene Faktoren beim Modell

4.5.1 Fibrinkleber

In vielen Experimenten im Tissue Engineering, wird käuflich erworbener humaner Fibrinkleber verwendet. Um diesen immunogenen Faktor⁵³ auszuschalten, bemühten wir uns, weniger immunogenen Fibrinkleber herzustellen. Ideal wäre autologer Fibrinkleber, gewonnen aus dem Plasma des Kaninchens, das anschließend seine Transplantate erhält. Aus ethischen und technischen Gründen konnte aber die Fibrinkleber – Komponente der

Transplantate nicht autolog gewonnen werden. Wir konnten die Tiere nicht präoperativ dem Streß rezidivierender Blutentnahmen aussetzen und hätten auch nicht das erforderliche Volumen an Plasma gewinnen können. Der Fibrinkleber wurde daher allogen, aus gekauftem Kaninchen – Plasma gewonnen. Dieser Faktor wurde aber im Versuch konstant gehalten: alle Transplantate, außer den nativen, enthielten den allogenen Fibrinkleber. An einem größeren Tiermodell und am Menschen wird es möglich sein, auch den Fibrinkleber autolog herzustellen.

4.5.2 Vlies

Im Tissue Engineering finden die auch in diesem Versuch verwendeten Polyglycolid- / Polylactidsäuren breite Anwendung^{54,55}. Das Polyglycolsäure-polylactat – Vlies selbst kann Angriffsort einer unspezifischen Immunabwehr im Sinne einer Fremdkörperreaktion sein. So beobachteten bereits Britt et al. eine Immunreaktion in Form von Fremdkörperriesenzellen und chronischer Inflammation und diskutierten dies als (zusätzlichen) Grund der mäßig ausgebildeten Matrix der in ihrem Versuch eingesetzten Chondrocyten. Das bei seiner Biodegradation entstehende saure Milieu könnte einerseits die Bildung von Knochen und andererseits die Chemotaxis von Entzündungszellen unterstützen bzw. bewirken.

4.5.3 Zellen

Chondrozyten bleiben dem ausgereiften Immunsystem eigentlich verborgen. Sie sind geschützt in der Matrix, umsäumt vom Perichondrium. Eine Antigenität kann von den „nackten“, dem Immunsystem unbekannten Chondrozyten ausgehen. In der Arbeit von Bujia et al.⁵⁶ konnte ein erhöhter Anti-Chondro-IgM nachgewiesen werden. Es erschien daher sinnvoll, das Immunsystem während der Phase, in der sich die Matrix ausbildet, zu supprimieren.

4.6 Wahl des Immunsuppressivums

4.6.1 Warum Immunmodulation?

Es ist nicht selbstverständlich, daß eine Immunmodulation im immunkompetenten Tier bei autologer Transplantation notwendig ist. Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Untersuchungen von Dorfman et al. an Myoblasten: bei deren autologer Implantation war keine Immunmodulation notwendig. In diesem Versuch wurde ein Zeitraum von 4 Wochen in vivo gewählt⁵⁷. Selbst der erste Zeitpunkt der Untersuchung ist

in der vorliegenden Arbeit länger gewählt worden. In einer möglichen klinischen Anwendung wird vom Transplantat eine längere Überlebensdauer verlangt werden.

4.6.2 Warum Methylprednisolon?

Da in einer möglichen späteren klinischen Anwendung keine lebenslange Immunsuppression angestrebt werden kann, mußte das zu wählende Immunsuppressivum an den ersten Schritten der Immunabwehr angreifen. Der Interleukin-2 Inhibitor Ciclosporin greift aber an der T-Zell vermittelten spezifischen Immunabwehr an und war daher nicht das geeignetste Medikament. Corticosteroide erschienen aufgrund der Anforderungen und der oben beschriebenen Wirkungen als die beste Wahl. In einem Kaninchen–Ohr–Modell wurde das Überleben von gegenüber eingesetzten Transplantaten unter peri- und postoperativer MP-Gabe untersucht (30 mg / kg Körpergewicht über 5 Tage i.m.). MP zeigte bessere Ergebnisse hinsichtlich des Transplantatüberlebens als ein Cyclooxygenase / Lipooxygenase-Inhibitor⁵⁸. MP in einer Dosierung von 1,0 mg / kg KG ist in der Lage die zirkulierenden T-Zellen zu reduzieren⁵⁹. Eine einmalige Hochdosis Therapie (20 mg / kg KG) mit MP hingegen war von unerwünschten Nebenwirkungen im Kaninchenmodell begleitet: multifokale Osteonekrosen in mehreren Knochen wurden in der Literatur beschrieben⁶⁰. Die topische Gabe von Immunsuppressiva ist eine den Organismus des Empfängers am wenigsten belastende Applikationsform und kommt bei Corneal – Grafts zur Anwendung⁶¹. Uns stand aber keine überzeugende subkutane Applikation zur Verfügung, die nicht das Risiko einer Infektion im Transplantatbett erhöht hätte.

4.6.3 Rolle von Corticoiden bei der Knochenentstehung

Wahrscheinlich ist dem Corticosteroid eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Knochen statt Knorpel zuzuschreiben. In üblichen für die in vitro Züchtung von Osteozyten hergestellten Medien findet sich oftmals ein Anteil eines Corticoids. Systemisch allerdings konnte bisher keine Induktion von Knochengewebe durch Corticosteroide sondern vielmehr die vom Menschen bekannte Proteolyse und die ihr entsprechende Osteoporose auch beim Kaninchen beobachtet werden. Unsere Beobachtungen bzgl. der Knochenbildung stehen im Widerspruch zu einigen Untersuchungen von Wirkungen der Corticosteroide auf das Knochenwachstum. Suppressiva Effekte auf das Knochenwachstum wurden bei der Behandlung von Kaninchen – Ulnae – Defekten mit MP (1 mg / kg KG) beschrieben⁶². Das longitudinale Knochenwachstum war unter der Applikation von 4 mg bzw. 16 mg / kg KG

Hydrocortison verringert⁶³. Auch das appositionelle Knochenwachstum im Kaninchen war unter Hydrocortison – Behandlung (2 mg / kg KG) geringer^{64 65}. Die Eigenschaft der Corticoide, ektope Knochenbildung zu verhindern, findet klinisch sogar Anwendung⁶⁶. Lediglich die Ossifikation von Ohren im Rahmen einer Addison – Krise ist in der Literatur beschrieben⁶⁷. Unsere Tiere zeigten keinen klinischen Anhalt für eine Addison – Krise, die Dauer der Behandlung wäre zu kurz zum Auslösen dieses Krankheitsbildes und die ausschleichende Dosierung des Corticoids sollte eine überschießende Antwort des Immunsystems durch plötzliches Auslassen verhindern.

4.7 Heterotope Transplantation

Die heterotope Transplantation kann als zusätzlicher immunogener Reiz wirken. Bei plastischen Nasenoperationen ist die Resorption des autologen Knorpels ein selbst den Boulevard-Blättern bekanntes Problem und damit kein allein TE-spezifisches Problem.

4.8 Vorgänge innerhalb des um das Transplantat liegenden Gewebes

4.8.1 Verhinderung des „Ag“-Ak-Kontaktes durch Immunmodulation

Normalerweise ist Knorpel durch das Perichondrium abgeschirmt. Nur bei pathologischen Zuständen kommt das intakte Immunsystem mit Chondrocyten oder Matrix in Kontakt – bei einem Trauma oder der rheumatoiden Arthritis. In diesem Versuch kommt das Immunsystem durch das Einbringen der Transplantate mit den Antigenen Chondrocyt und Matrix (Kollagenen) in Kontakt. Man kann annehmen, daß die Abschirmung des werdenden Knorpels durch MP eine frühe Kontaktaktivierung des Immunsystems verhindert. Und so kann die Matrix ungehindert ausreifen und das Transplantat erhalten bleiben. Die Transplantate der immunmodulierten Tiere wurden bei Implantation mit Lederlon benetzt, um die Zeit des Anflutens des MP-Spiegels im Kaninchen-Blut zu überbrücken.

4.9 Tiermodell

Das Tiermodell scheint hinsichtlich der immunsuppressiven Symptomatik weniger disputabel als hinsichtlich der Ausbildung von Knochen- statt Knorpelgewebe. Wie unter 4.6.3 beschrieben wäre das Gegenteil am Kaninchen zu erwarten gewesen: Osteoporose anstelle von Knochenbildung. Dem Argument, daß gerade bei heterotoper Transplantation eine Ossifikation im Kaninchen nichts Ungewöhnliches sei, steht die Tatsache gegenüber, daß im hier beschriebenen Tierversuch die ebenfalls heterotop implantierten nativen Transplantate nicht ossifiziert sind. Die alleinige Anwesenheit des hier verwendeten

Scaffolds, das sich in Biodegradation befindet und dadurch lokal eine Azidität verursacht, bewirkt keine Knochenneubildung – entsprechende Untersuchungen sind durch Vorversuche unserer Arbeitsgruppe durchgeführt worden. Auch Untersuchungen von ten Koppel et al. am Kaninchen, bei dem u. a. demineralisierte bovine Knochenmatrix ohne Zellen implantiert wurde, zeigten keine Gewebebildung⁶⁸. Wenn man das Tiermodell für die Ausbildung von Knochengewebe verantwortlich macht, dann nur in Verbindung mit den anderen Umständen dieses Versuchs.

4.10 Mögliche Gefahren der autologen Transplantation

Als eine theoretisch mögliche aber sehr geringe Gefahr der autologen Transplantation sehe ich die Möglichkeit, daß das Immunsystem eines Patienten, das vorher nicht in Kontakt mit Chondrocyten kam, die Immunkompetenz durch ein derartiges Transplantat erst erwirbt und dann Krankheiten im Sinne von Autoimmunerkrankungen ermöglicht werden. Dies könnte nur bei prädisponierten Patienten passieren. Denn auch unter den Bedingungen orthopädischer und unfallchirurgischer Eingriffe ist dies nicht beschrieben.

4.11 Ausblick

Eine Wiederholung der Versuche ist bereits in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer weiteren Dissertation im Bereich Tissue Engineering durchgeführt worden. Um dem Ziel, der klinischen Anwendung, näher zu kommen, müssen Versuche dieser Art mit einer dem Menschen ähnlicheren Tier-Spezies mit einem differenzierteren Immunsystem durchgeführt werden. Erfolgversprechende Versuche mit größeren Transplantaten sind in vitro und in vivo durchgeführt worden. Spektakulär war und ist die Herstellung komplexer dreidimensionaler Strukturen wie dem menschlichen Ohr.⁶⁹ In der Arbeitsgruppe Haisch / Sittinger laufen entsprechende Vorhaben in vitro und in vivo.



Abbildung 45: TE-Ohr aus Chondrocyten, Fibrinkleber und Vliesfasern vor der Implantation in ein Versuchstier. AG Haisch / Sittinger

Anwendungen des TE Knorpels lägen neben in der HNO, der plastischen Chirurgie und in der Orthopädie bzw. Rheumatologie beim Gelenkknorpelersatz. Jedoch stellt die Verknüpfung des Knorpels mit dem Knochen und seine Stabilität noch eine Herausforderung dar⁷⁰. Ziel aller Bemühungen wird das autologe Knorpeltransplantat an einem Menschen sein. Ein wirkungsvoller immunologischer Schutz wird vonnöten sein. Der selektive Transplantatschutz unter Beibehaltung der Immunabwehr – wie beim Allotransplantat - stellt hier die Herausforderung dar. Der Goldstandard wäre wie in der Allotransplantatchirurgie die Immunmodulation durch Antikörper gegen spezifische Lymphozyten - und zwar jene, die Chondrocyten angreifen.

5 Zusammenfassung

Im medizinischen Alltag steht Gewebeersatz oftmals nicht ausreichend zur Verfügung. Tissue Engineering bietet eine wertvolle Methode, um aus geringen Mengen Ausgangsmaterials (Zellen) größere Strukturen (Gewebe) herzustellen. Aber selbst autologe über Tissue Engineering gebildete Gewebe können einer Abstoßung unterliegen. Diese Arbeit befaßt sich mit der Immunmodulation implantierter TE-Transplantate.

5.1 Vorgehensweise

Chondrocyten wurden aus Ohren von Neuseeland-Kaninchen enzymatisch isoliert, in Zellkultur vermehrt und in ein Scaffold eingebracht. Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen, wurden sie in a) allogenen Fibrinkleber und b) in Agarose suspendiert. Die Einkapselung eines Teils der Fibrinkleber – Transplantate erfolgte mittels einer Polyelektrolyt – Membran. Nativer Ohrknorpel diente als Kontrolle. Eine in vitro ernährte Vergleichsgruppe wurde parallel kultiviert. Zellsuspension wurde in Scaffolds gegeben und diese subkutan auf dem Rücken der Kaninchen implantiert. Eine der in zwei Gruppen aufgeteilten Kaninchen erhielt eine 3 wöchige i. m. Gabe von Methylprednisolon. Nach 6 und 12 Wochen wurden die Transplantate entnommen und histologisch untersucht. So entstanden n=84 Transplantate, jeweils 14 autologe Transplantate pro Kaninchen. Davon gab es jeweils 2 native, 4 Fibrin-, 4 Agarose- und 4 Kapsel-Transplantate. 70 Transplantate wurden in 5 Versuchstiere implantiert. 14 Transplantate wurden in vitro ernährt. 2 Kaninchen wurden nach 6 Wochen getötet und die Transplantate entnommen. 3 Kaninchen wurden nach 12 Wochen getötet. Im Anschluß wurden die Transplantate histologisch untersucht.

5.2 Ergebnisse

Die Transplantate der nicht immunmodulierten Tiere konnten zu den Entnahmezeitpunkten 6 und 12 Wochen kaum aus den Implantationsorten entnommen werden: sie waren nur schwer vom umliegenden Gewebe zu unterscheiden. Im Gegensatz hierzu blieben die Transplantate der immunmodulierten Tiere in ihrer Größe konstant. Histologisch zeigte sich bei den nicht immunmodulierten Tieren bereits nach 6 Wochen massive zelluläre Infiltration, nach 12 Wochen eine bindegewebige Einwachsung von Fibrozyten und kaum noch Knorpel- oder Knochengewebe. In der Gruppe der immunmodulierten Tiere konnte keine bis eine geringe Inflammation festgestellt werden. Der Vergleich der Gruppen „Nicht immunmoduliert“ und „Immunmoduliert“ war hinsichtlich der Immunreaktionen

statistisch signifikant (Chi-Quadrat Test nach Pearson). In allen immunmodulierten Transplantaten, bis auf die nativen, war vitaler trabekulärer Knochen mit hämatopoetisch aktivem Knochenmark zu beobachten.

5.3 Schlußfolgerungen

Diese Untersuchung zeigt erstens, daß die Verwendung autologer TE - Transplantate allein nicht die Lösung für das Problem der Abstoßung ist. Zweitens eine temporäre systemische Applikation von MP in antiphlogistischer Wirkung ist eine mögliche, sinnvolle Unterstützung (In diesem Versuch wurde dadurch das Überleben autologer TE – Transplantate verlängert bzw. ermöglicht) und drittens scheint eine Corticoid vermittelte Induktion von Knochenwachstum unter entsprechenden Randbedingungen auch in vivo möglich zu sein.

6 Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Michael Sittinger und Herrn Dr. Andreas Haisch für ihre Betreuung und Unterstützung ebenso wie für die Möglichkeit der Kongreßteilnahme in den USA. Auch bedanke ich mich für die enge Kooperation mit der Pathologie durch Frau Dr. Cornelia Radke und ihre Hilfe bei der histologischen Bewertung. Für die unzähligen Ideen und Hilfestellungen zur Bewältigung organisatorischer sowie methodischer Probleme danke ich Svea Klaering, Michaela Endres, Alexander Loch und Andreas Gröger. Meiner Mutter danke ich dafür, daß ich meinen Weg gehen konnte und meinem Vater für das in mich gesetzte Vertrauen.

7 Erklärung an Eides statt

Die Dissertation ist von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt worden. Auch in Teilen stellt sie keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, 7.Oktober 2002

Frank Wanjura

8 Literatur

- 1 Definition der National Foundation, Lake Tahoe, CA 1987
- 2 Junqueira LC, Carneiro J. Histologie. 4. Auflage. Springer 1996
- 3 Leonhardt H. Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 8. Auflage. Thieme 1990
- 4 Roitt I-M, Brostoff J, Male D-K: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 3. Auflage. Thieme 1995
- 5 Dautzenberg H, Holzapfel G, Lukanoff B: Methods for a comprehensive characterization of microcapsules based on polyelectrolyte complexes. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 1993;21(3):399-405
- 6 Dautzenberg H, Holzapfel G, Lukanoff B: Methods for a comprehensive characterization of microcapsules based on polyelectrolyte complexes. *Biomaterials, artificial cells, and immobilization biotechnology : official journal of the International Society for Artificial Cells and Immobilization Biotechnology*; 21; 3; 399-405; 1993
- 7 Dautzenberg H, Schuldt U, Grasnick G, Karle P, Muller P, Lohr M, Pelegrin M, Piechaczyk M, Rombs KV, Gunzburg WH, Salmons B, Saller RM: Development of cellulose sulphate based polyelectrolyte complex microcapsules for medical applications. *Ann New York Aca Sci.* 875: 46-63 (1999)
- 8 Stange J, Mitzner S, Dautzenberg H, Ramlow W, Knippel M, Steiner M, Ernst B, Schmidt R, Klinkmann H: Prolonged biochemical and morphological stability of encapsulated liver cells- A new method. *Biomater., Art. Cells, Biotech.* 21: 343-352 (1993)
- 9 Stange J, Dummmler W, Bruegmann E, Falkenhagen D, Siegmund E, Ernst B, Dautzenberg H: An improved method for the microencapsulation of liver microsomes for use in extracorporeal detoxication. *Z Med Lab Diagn; Vol. 31*, 366-70 (1990)

-
- 10 Mansfeld J, Förster M, Schellenberger A, Dautzenberg H: Immobilization of invertase by encapsulation in polyelectrolyte complexes. *Enzyme and microbial technology*; 13; 3; 240-4; 199103
 - 11 Goldberg VM, Caplan AI: Biological resurfacing: an alternative to total joint arthroplasty. *Orthopedics*. 1994 Sep; 17(9): 819-21
 - 12 Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, Schloo B, Mooney D, Vacanti CA: Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Int-J-Oral-Maxillofac-Surg*. 1994 Feb; 23(1): 49-53
 - 13 Puelacher WC, Wisser J, Vacanti CA, Ferraro NF, Jaramillo D, Vacanti JP: Temporomandibular joint disc replacement made by tissue-engineered growth of cartilage. *J-Oral-Maxillofac-Surg*. 1994 Nov; 52(11): 1172-7
 - 14 Puelacher WC, Mooney D, Langer R, Upton J, Vacanti JP, Vacanti CA: Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. *Biomaterials* 1994 Aug; 15 (10): 774-8
 - 15 Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, Schloo B, Mooney D, Vacanti CA: Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Int-J-Oral-Maxillofac-Surg*. 1994 Feb; 23(1): 49-53
 - 16 Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, Langer R: Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology-N-Y*. 1994 Jul; 12 (7): 689-93
 - 17 Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E, Planck H, Burmester GR, Bujia J: Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J-Biomed-Mater-Res*. 1996; 33 (2): 57-63
 - 18 Sittinger M, Schultz O, Keyszer G, Minuth WW, Burmester GR: Artificial tissues in perfusion culture. *The international Journal of artifical Organs* 1997; 20 (1): 57-62

-
- 19 Li J, Xu P, Chen H, Yang Z, Zhang Q: Improvement of tracheal autograft survival with transplantation into the greater omentum. *Ann-Thor-Surg*. 1995 Dec; *60* (6): 1592-6
 - 20 Desjardins MR, Hurtig MB, Palmer NC: Heterotopic transfer of fresh and cryopreserved autogenous articular cartilage in the horse. *Vet-Surg*. 1991 Nov-Dec; *20* (6): 434-45
 - 21 Rotter N, Aigner J, Naumann A, Planck H, Hammer C, Burmester G, Sittinger M: Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J-Biomed-Mater-Res*. 1998 Dec; *42* (3): 347-56
 - 22 Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R: Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J-Biomed-Mat-Res*. 1997 Feb; *34* (2): 211-20
 - 23 Cao Y, Rodriguez A, Vacanti M, Ibarra C, Arevalo C, Vacanti CA: Comparative study of the use of poly, calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J-Biomater-Sci-Polym-Ed*. 1998; *9* (5): 475-87
 - 24 Brun P, Abatangelo G, Radice M, Zacchi V, Guidolin D, Daga Gordini D, Cortivo R: Chondrocyte aggregation and reorganization into three-dimensional scaffolds. *J-Biomed-Mater-Res*. 1999 Sep; *46* (3): 337-46
 - 25 Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI: Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J-Orthop-Res*. 1999 Mar; *17* (2): 205-13
 - 26 Radice M, Brun P, Cortivo R, Scapinelli R, Battaliard C, Abatangelo G: Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. *J-Biomed-Mater-Res*. 2000 May; *50* (2): 101-9
 - 27 Aigner J, Tegeler J, Hutzler P, Campoccia D, Pavesio A, Hammer C, Kastenbauer E, Naumann A: Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J-Biomed-Mater-Res*. 1998 Nov; *42* (2): 172-81

-
- 28 Sechriest VF, Miao YJ, Niyibizi C, Westerhausen-Larson A, Matthew HW, Evans CH, Fu FH, Suh JK: GAG-augmented polysaccharide hydrogel: a novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis. *J-Biomed-Mater-Res.* 2000 Mar; *49* (4): 534-41
 - 29 Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z: Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 1996 Jan; *17* (2): 137-46
 - 30 Perka C, Spitzer RS, Lindenhayn K, Sittering M, Schultz O: Matrix mixed culture: new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants. *J-Biomed-Mater-Res.* 2000 Mar; *49* (3): 505-11
 - 31 Perka C, Arnold U, Spitzer RS, Lindenhayn K: The use of fibrin beads for tissue engineering and subsequential transplantation. *Tissue Engineering* 2001 Jun; *7*; 3: 359-61
 - 32 Goldberg VM, Caplan AL: Biological resurfacing: an alternative total joint arthroplasty. *Orthopedics.* 1994 Sep; *17* (9): 819-21
 - 33 Ohgushi H, Caplan AI: Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J-Biomed-Mater-Res.* 1999; *48* (6): 913-27
 - 34 Ducy P, Schinke T, Karsenty G: The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000 Sep; *289*: 1501-14
 - 35 Puelacher WC, Mooney D, Langer R, Upton J, Vacanti JP, Vacanti CA: Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. *Biomaterials.* 1994 Aug; *15* (10): 774-8
 - 36 Puelacher WC, Wisser J, Vacanti CA, Ferraro NF, Jaramillo D, Vacanti JP: Temporomandibular joint disc replacement made by tissue-engineered growth of cartilage. *J-Oral-Maxillofac-Surg.* 1994 Nov; *52* (11): 1172-8
 - 37 Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, Schloo B, Mooney D, Vacanti CA: Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Int-J-Oral-Maxillofac-Surg.* 1994 Feb; *23* (1): 49-53

-
- 38 Freed LE, Langer R, Martin I, Pellis NR, Vunjak-Novakovic G: Tissue engineering of cartilage in space. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*. 1997 Dec; *94* (25): 13885-90
- 39 Riesle J, Hollander AP, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G: Collagen in tissue-engineered cartilage: types, structure and crosslinks. *J-Cell-Biochem*. 1998 Dec; *71* (3): 313-27
- 40 Isogai N, Landis W, Kim TH, Gerstenfeld LC, Upton J, Vacanti JP: Formation of phalanges and small joints by tissue-engineering. *J-Bone-Joint-Surg-Am*. 1999 Mar; *81* (3): 303-16
- 41 Sittinger M, Perka C, Schultz O, Haupl T, Burmester GR: Joint cartilage regeneration by tissue engineering. *Z-Rheumtol*. 1999 Jun; *58* (3): 130-5
- 42 Richardson JB, Caterson B, Evans EH, Ashton BA, Roberts S: Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J-Bone-Joint-Surg-Br*. 1999 Nov; *81* (6): 1064-8
- 43 Sittinger M, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR: Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with bioresorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials* 1996 Feb; *17* (3): 237-42
- 44 Sims CD, Butler PE, Cao YL, Casanova R, Randolph MA, Black A, Vacanti CA, Yaremchuk MJ: Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast-Reconstr-Surg*. 1998 May; *101* (6): 1580-5
- 45 Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ: Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 1999 Jan; *20* (1):45-53
- 46 Haisch A, Groger A, Radke C, Ebmeyer J, Sudhoff H, Grasnick G, Jahnke V, Burmester GR, Sittinger M: Macroencapsulation of human cartilage implants: pilot study with polyelectrolyte complex membrane encapsulation. *Biomaterials*. 2000 Jan; *21*: 1561-6

-
- 47 Panossian A, Ashiku S, Kirchhoff CH, Randolph MA, Yaremchuk MJ: Effects of cell concentration and growth period on articular and ear chondrocyte transplants for tissue engineering. *Plastic and Reconstructive Surg.* 2001 Aug. *108*; 2: 392-402
- 48 Benya PD, Brown D: Modulation of the chondrocyte phenotype in vitro. *Articular Cartilage Biochemistry*. New York: Raven Press 1978: 219-233
- 49 Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR: Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* 1994, *15* (6): 451-456
- 50 Benya PD, Shaffer JD: Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982; *30*: 215-224
- 51 Martin I, Suetterlin R, Baschong W, Heberer M, Vunjak-Novakovic G, Freed LE: Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *Journal of cellular biochemistry* 2001 Jun. *83*; *1*: 121-8
- 52 Frenkel SR, Saadeh PB, Mehrara BJ, Chin GS, Steinbrech DS, Brent B, Gittes GK, Longaker MT: Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast. Reconstr. Surg.* 2000; *105*: 980-90
- 53 Nagelschmidt M, Roddecker K, Gierse T, Troidl H: Einfluß verschiedener Fibrinkleber auf die Fibroblasten-Aktivität in Hautwunden. *Arzneimittelforschung* 1990 Okt.; *40* (10): 1166-71
- 54 Kim BS, Mooney DJ: Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Tibtech* *16*:224- 230 (1998)
- 55 Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R: Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biom Mat Res* *34*:211- 220 (1997)
- 56 Bujia J, Alsalameh S, Naumann A, Wilmes E, Sittinger M, Burmester GR: Humoral immune response against minor collagens type IX and XI in patients with cartilage

-
- graft resorption after reconstructive surgery. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1994; 53: 229-34
- 57 Dorfman J, Duong M, Zibaitis A, Pelletier MP, Shum-Tim D, Li C, Chiu RC: Myocardial tissue engineering with autologous myoblast implantation. *J-Thorac-Cardiovasc-Surg.* 1998 Nov; 116 (5): 744-51
 - 58 Fann PC, Hartman DF, Goode RL: Pharmacologic and surgical enhancement of composite graft survival. *Arch-Otolaryngol-Head-Neck-Surg.* 1993; 119: 313-9
 - 59 Piekoszewski W, Chow FS, Jusko WJ: Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of coadministration of methylprednisolone and tacrolimus in rabbits. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 1994; 269 (1): 103-9
 - 60 Yamamoto T, Irida T, Sugioka Y, Sueishi K: Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues. *Arthritis and Rheumatism.* 1997 Nov; 40 (11): 2055-64
 - 61 Williams KA, Grutzmacher RD, Roussel TJ, Coster DJ: A comparison of the effects of topical cyclosporine and topical steroid on rabbit corneal allograft rejection. *Transplantation* 1985; 39 (3): 242-4
 - 62 Ho ML, Chang JK, Wang GJ: Antiinflammatory drug effects on bone repair and remodeling in rabbits. *Clinical Orthopaedics and related Research.* 1995; 313: 270-78
 - 63 Moell C, Aronson AS, Selvik G: Growth in rabbits during alternate-day cortisone injections: near normal growth on days without cortisone. *Acta Paediatrica Scandinavica.* 1988 Sep; 77 (5): 693-8
 - 64 Tam CS, Cruickshank B, Swinson DR, Anderson W, Little HA: The response of bone apposition rate to some nonphysiologic conditions. *Metabolism: Clinical and Experimental.* 1979 Jul; 28 (7): 751-5
 - 65 Lyritis G, Papadopoulou Z, Nikiforidis P, Batrinos M, Varonos D: Effects of cortisone and an anabolic steroid upon plasma hydroxyproline during fracture healing in rabbits. *Acta-Orthop-Scand.* 1975 Apr; 46 (1): 25-30

-
- 66 Brantus JF, Meunier PJ: Effects of intravenous etidronate and oral corticosteroids in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin-Orthop*. 1998 Jan; 346: 117-20
- 67 Rodriguez Rodriguez R, Ontanilla Lopez A, Rodriguez Rodriguez C, Herrera Silva J, Echevarria Moreno M, Martinez Diestre MD: Bilateral ossification of the earlobes. Addisonian crisis in the postoperative period. *Rev-Esp-Anesthesiol-Reanim*. 1991 Nov-Dec; 38 (6): 391-2
- 68 ten Koppel PG, van Osch GJ, Verwoerd CD, Verwoerd-Verhoef HL: A new in vivo model for testing cartilage grafts and biomaterials: the 'rabbit pinna punch-hole' model. *Biomaterials* 2001 Jun; 22; 11; 1407-14
- 69 Saim AB, Cao Y, Weng Y, Chang CN, Vacanti MA, Vacanti CA, Eavey RD: Engineering autogenous cartilage in the shape of a helix using injectable hydrogel scaffold. *The Laryngoscope* 2000 Oct; 110: 1694-97
- 70 Schaefer D, Martin I, Shastri P, Padera RF, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G: In vitro generation of osteochondral composites. *Biomaterials* 2000 Dec. 21; 24; 2599-606